

Obrazac broj 10. Tehnički opis i struktura doktorske disertacije kao monografije

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Mirna Volenik, mag. ing. agr.

**UPORABA FLUORESCENCIJE KLOROFILA a U INDIREKTHNOJ
SELEKCIJI ZA AGRONOMSKA SVOJSTVA KUKURUZA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Mirna Volenik, mag. ing. agr.

**UPORABA FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a* U INDIREKTHNOJ
SELEKCIJI ZA AGRONOMSKA SVOJSTVA KUKURUZA**

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Mirna Volenik, mag. ing. agr.

**UPORABA FLUORESCENCIJE KLOROFILA a U INDIREKTNOJ
SELEKCIJI ZA AGRONOMSKA SVOJSTVA KUKURUZA**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

Povjerenstvo za ocjenu:

1. **dr. sc. Ime Prezime, redoviti profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednik**
2. **dr. sc. Ime Prezime, izvanredni profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, mentor i član**
3. **dr. sc. Ime Prezime, redoviti profesor Agronomskog fakulteta u Zagrebu, član**

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Mirna Volenik, mag. ing. agr.

**UPORABA FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a* U INDIREKTNJOJ
SELEKCIJI ZA AGRONOMSKA SVOJSTVA KUKURUZA**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

Javna obrana doktorske disertacije održana je godine pred Povjerenstvom za
obranu:

1. dr. sc. Ime Prezime, redoviti profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek,
predsjednik
2. dr. sc. Ime Prezime, izvanredni profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti
Osijek, mentor i član
3. dr. sc. Ime Prezime, redoviti profesor Agronomskog fakulteta u Zagrebu, član

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Genetika i oplemenjivanje bilja, životinja i mikroorganizama

Uporaba fluorescencije klorofila *a* u indirektnoj selekciji za agronomska svojstva kukuruza

Mirna Volenik, mag. ing. agr.

Disertacija je izrađena na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Sonja Vila

Sažetak (do 2000 karaktera)

Broj stranica:

Broj slika:

Broj tablica:

Broj literaturnih navoda:

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi:

Datum obrane:

Povjerenstvo za obranu:

1. **prof. dr. sc. Ime Prezime** – funkcija
2. **prof. dr. sc. Ime Prezime** – funkcija
3. **prof. dr. sc. Ime Prezime** – funkcija

Disertacija je pohranjena u:

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Postgraduate university study: Agricultural sciences

Course:

UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Agriculture

Branch:

Use of chlorophyll *a* fluorescence in indirect selection for agronomic characteristics of maize

Mirna Volenik, mag. ing. agr.

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

Supervisor: Prof. dr. sc. Name Surname

Short abstract (up to 2000 characters)

Number of pages:

Number of figures:

Number of tables:

Number of references:

Original in: croatian

Key words:

Date of the thesis defense: October 15th, 2015.

Reviewers:

1. **PhD Name Surname, professor** – function
2. **PhD Name Surname, professor** – function
3. **PhD Name Surname, professor** – function

Thesis deposited in:

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

KAZALO

1. UVOD.....	3
1.1. PREGLED LITERATURE.....	5
1.1.1. Povećanje prinosa kukuruza oplemenjivanjem.....	5
1.1.2. Indirektna selekcija kukuruza.....	8
1.1.3. Uporaba fluorescencije u indirektnoj selekciji kukuruza.....	14
1.2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	23
2. MATERIJAL I METODE RADA.....	24
2.1. Biljni materijal i dizajn pokusa.....	24
2.2. Agrotehnika i prinos zrna.....	25
2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i>	26
2.4. Izrada prediktivnih statističkih modela.....	30
2.5. Statistička obrada podataka i izrada statističkih modela.....	31
2.6. Agroklimatološki uvjeti.....	33
3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	37
3.1. Analiza varijance prinosa zrna.....	37
3.2. Analiza varijance vlage zrna u berbi.....	39
3.3. Analiza varijance kvantnog prinosa primarnih fotokemijskih reakcija (F_v/F_m)	41
3.4. Analiza varijance fotosintetičke učinkovitosti fotosustava II (PI_{ABS}).....	43
3.5. OJIP tranzijenti kroz tri godine istraživanja.....	45
3.6. Komponente varijance procijenjene mješovitim modelom i korelacije za prinos zrna, vlagu zrna, F_v/F_m te PI_{ABS}	47
3.7. Analiza genotipskih i genotip x okolina efekata.....	48
3.8. Statistički modeli za predviđanje prinosa zrna.....	50
3.9. Statistički modeli za predviđanje vlage zrna u berbi.....	54
3.10. Komponente varijance predviđenih svojstava.....	59
4. RASPRAVA.....	63
4.1. Analiza varijance agronomskih svojstava.....	63
4.2. Analiza varijance svojstava fotosintetske učinkovitosti.....	65
4.3. Analiza učinkovitosti modela za predviđanje prinosa.....	66
4.4. Analiza učinkovitosti modela za predviđanje vlage zrna.....	69
4.5. Analiza učinkovitosti indirektna selekcije.....	71
5. ZAKLJUČCI.....	73
6. LITERATURA.....	75

7. SAŽETAK.....	86
8. SUMMARY.....	88
9. PRILOG.....	90
ŽIVOTOPIS.....	96

1. UVOD

Kukuruz je uz pšenicu i rižu jedna od najvažnijih žitarica koja se koristi za ljudsku prehranu, hranidbu stoke, dobivanje etanola i plina te industrijsku preradu. Zbog izrazite gospodarske važnosti kukuruza, njegovo oplemenjivanje ima važnu ulogu u dobivanju novih hibrida više rodnosti, bolje prilagođenosti potrebama tržišta i izraženije tolerancije na stres. Većina proizvedenog kukuruza na svijetu su hibridi dobiveni konvencionalnim i molekularnim metodama oplemenjivanja bilja. Proces konvencionalnog oplemenjivanja kukuruza je spor te uz sjetvu dvije generacije godišnje (po jedna na sjevernoj i južnoj hemisferi) jedan oplemenjivački ciklus traje 7 do 10 godina (**Bernardo**, 2010.). Obzirom da je cilj oplemenjivačkog programa maksimizacija genetičke dobiti po jedinici uloženog vremena i sredstava, cilj modernih oplemenjivačkih programa je pronalazak sekundarnih svojstava koja su korelirana s prinosom, jednostavna za mjerenje i imaju visoku heritabilnost (**Ziyomo i Bernardo**, 2013.) te omogućuju indirektnu selekciju za svojstva od interesa. Najvažnija svojstva hibrida kukuruza su prinos zrna i vlaga zrna u berbi (**Troyer**, 1996.).

Najveće povećanje prinosa kukuruza ostvareno je zahvaljujući napretku u oplemenjivanju za toleranciju na stresne uvjete poput gustog sklopa, niskih noćnih temperatura, niskog sadržaja vode i slabe gnojide dušikom (**Tollenaar i Wu**, 1999.), a porast prinosa tijekom 20. stoljeća bio je višestruk. U razdoblju između 1987. i 2015. godine utvrđen je porast prosječnog prinosa kukuruza od približno 50 % zahvaljujući napretku u oplemenjivanju i agrotehnici (**Assefa i sur.**, 2018.). Značajnu ulogu u oplemenjivanju za prinos zrna imala su sekundarna svojstva (**Duvick**, 2005.). Sekundarna svojstva su ona koja su korelirana sa svojstvima od interesa, a nisu primarni cilj oplemenjivačkog programa.

Često korištena sekundarna svojstva u selekciji za prinos zrna su interval između polinacije i svilanja (ASI) te broj klipova po biljci. Korištenjem ova dva svojstva autori **Chapman i Edmeades** (1999.) ostvarili su pozitivne genetičke dobiti za prinos korištenjem germplazme tropskog kukuruza u navodnjavanim uvjetima kao i u uvjetima s ograničenom dostupnosti vode. Važnost ovih svojstava u indirektnoj selekciji potvrdili su i (**Betrán i sur.**, 2003.). U svojim istraživanjima **Monneveux i sur.** (2008.) identificirali su uz ASI i svojstva metlice kao važna sekundarna svojstva u selekciji za prinos, dok je u istraživanju

Messmera i sur. (2009.) utvrđena zajednička genetička osnova mnogih sekundarnih svojstava.

Velik dio sekundarnih svojstava zahtjeva procjenu nakon cvatnje. To znači da se ovim metodama poželjni roditelji identificiraju nakon razdoblja polinacije i oplodnje, što u praksi znači gubitak radne sezone za križanja i umnoženja identificirane germplazme. Osim navedenoga, kod nekih je metoda utrošak vremena za procjenu velik što povećava zahtjeve za razvoj novih metoda fenotipizacije s visokom propusnosti. Pristup indirektnoj selekciji statističkim modeliranjem korištenjem senzorskih, fiziološki relevantnih podataka stoga predstavlja novi izazov modernog oplemenjivanja bilja (**Araus i Cairns**, 2014.).

Kao odgovor na klimatske promjene, veliki naglasak u oplemenjivanju bilja stavlja se na pronalaženje brzo i lako mjerljivih fenotipskih svojstava visoke heritabilnosti koji pokazuju specifične odgovore na različite stresne uvjete. Zbog toga je razumjevanje fizioloških reakcija biljaka na sters bitno za razvoj hibrida s poboljšanom otpornošću na stres. Fotosinteza je jedan od najvažnijih procesa u biljnom svijetu, ali i prirodi uopće. Razni čimbenici stresa poput visokih temperatura ili nedostatka vode mogu dovesti do poteškoća u rastu, razvoju i reprodukciji kulturnog bilja. Proučavanje fotosintetskih mehanizama (**Kitajima i Butler**, 1975.; **Krause**, 1988.; **Guidi i Calatayud**, 2014.) vrlo je važan pravac istraživanja kako bi se postiglo što bolje razumjevanje o utjecaju nepovoljnih vanjskih uvjeta na proizvodnju kukuruza. Posljednjih godina pokazalo se da je analiza fluorescencije klorofila korisna tehnika za proučavanje utjecaja stresa na fotosintezu, odnosno fenotipizaciju u okviru oplemenjivanja kukuruza, budući da pruža neinvazivan i brz način mjerenja fiziološkog statusa biljaka i generira značajnu količinu podataka. Mjerenjem fluorescencije klorofila istraživači mogu steći uvid u funkcioniranje fotosintetskog aparata što je važno za razumjevanje učinka okolišnih čimbenika na rast i razvoj biljaka. Svaka promjena okoliša prisiljava fotosintetski aparat da u skladu s tim prilagodi svoje fiziološko stanje (**Strasser i sur.** 2004.)

Omjer između promjenjive (varijable) i maksimalne fluorescencije (F_v/F_m) opsežno se koristio kao pokazatelj fotosintetske učinkovitosti fotosustava II (PSII). Primjena fluorescencije klorofila u fenotipizaciji oplemenjivačkog materijala značajno je poboljšana u zadnja dva desetljeća, a formirani su i mnogi drugi informativni parametri za određivanje učinkovitosti PSII i raspodjele svjetlosne energije alternativnim mehanizmima (**Guidi i sur.** 2019.).

1.1. Pregled literature

1.1.1. Povećanje prinosa kukuruza oplemenjivanjem

Kukuruz je jedna od najvažnijih kulturnih biljaka na svijetu. Po proizvodnim količinama druga je kultura na svijetu, iza šećerne trske. Još prije desetak godina svjetska proizvodnja kukuruza premašila je milijardu tona godišnje te je i dalje u rastućem trendu - više od 1,2 milijarde 2021. godine (**FAOSTAT**, 2023.). Otkako je 2009. godine sekvencioniran genom kukuruza na poznatoj inbred liniji B73 (**Schnable i sur.**, 2009.), kukuruz se još više istaknuo kao biljka model za genetička, genomička i druga istraživanja (**Nannas i Dawe**, 2015.). Danas se kukuruz većim dijelom koristi kao stočna hrana i sirovina za industriju, ali sve više i za ljudsku prehranu. Vrijednost proizvodnje kukuruza 2021. godine iznosila je nešto više od 314 milijardi američkih dolara (**FAOSTAT**, 2023.). Uspoređujući današnju proizvodnju s nekim prijašnjim razdobljima (npr. nešto manje od 90 milijardi USD 2000. godine), razlika je drastična, što samo potvrđuje dominantnu poziciju kukuruza na globalnom tržištu žitarica, ratarskih kultura i kulturnog bilja uopće.

Najveći proizvođač kukuruza u svijetu su Sjedinjene Američke Države (oko 384 milijuna tona), Kina (oko 273 milijuna tona), Brazil (oko 88 milijuna tona), Argentina (oko 61 milijun tona) i Ukrajina (oko 42 milijuna tona), a ukupna svjetska proizvodnja iznosi oko 1,2 milijarde tona godišnje (svi podaci odnose se na 2021. godinu, **FAOSTAT**, 2023.). Veći proizvođači kukuruza u svjetskim razmjerima još su i Meksiko, Indija i Indonezija (više od 20 milijuna tona) te Francuska, Kanada, Južnoafrička Republika, Rumunjska, Rusija i Nigerija (preko 11 milijuna tona). Ovisno o povećanju proizvodnih površina i prinosa u pojedinim zemljama, ovaj poredak od godine do godine varira.

Prinos je glavni cilj u oplemenjivanju kukuruza. To je kompleksno, kvantitativno svojstvo ovisno o prirodnom fenomenu heterozisa (**Xiao i sur.**, 2021.) te brojnim okolinskim čimbenicima. U razdoblju prije korištenja hibrida u proizvodnji kukuruza prinosi po jedinici površine bili su daleko niži – koristile su se sorte, a genetika, oplemenjivanje i agronomija općenito bili su daleko od današnje razine. Otkrićem heterozisa i prebacivanjem fokusa istraživanja i oplemenjivanja na linije i hibride te snažnim razvojem agronomske prakse i struke, proizvodnja kukuruza nakon Drugog svjetskog rata počela se drastično povećavati. Svjetska proizvodnja kukuruza 1961. godine iznosila je nešto više od 205 milijuna tona, 1980. godine gotovo dvostruko više, na prijelazu milenija 2000. godine

oko 592 milijuna tona, a 2021. godine više nego dvostruko više, odnosno 1,21 milijardu tona (**FAOSTAT**, 2023.). Povećanje površina pratila je i veća proizvodnja, odnosno veći prinosi po jedinici površine. Prema petogodišnjem prosjeku (razdoblje 2017. - 2021.) prosječni prinos kukuruza u Hrvatskoj iznosi 8,13 t/ha, a u svijetu 5,81 t/ha (**FAOSTAT**, 2023.). Zemlje u kojima se postiže najveći prinos kukuruza su Španjolska (12,01 t/ha), Sjedinjene Američke Države (10,91 t/ha), Austrija (10,60 t/ha), Italija (10,29 t/ha) i Grčka (10,80 t/ha) te Njemačka (9,49 t/ha), Turska (9,32 t/ha) i Francuska (9,06 t/ha). Odmah iza njih su Bangladeš i Hrvatska s prosječnim prinosom od preko 8 t/ha. Pri dnu ljestvice zemalja s najvišim prinosima kukuruza su afričke zemlje, gdje u pojedinim regijama prinosi budu čak ispod jedne tone zrna po hektaru (korištenje sorata, loši uvjeti gospodarenja uzrokovani siromaštvom).

Prema **Troyer**u (2000.) prosječno povećanje prinosa kukuruza u Sjedinjenim Američkim Državama u razdoblju od 1930. do 1960. godine iznosilo je 63 kg/ha godišnje, a u narednih 40 godina taj pokazatelj gotovo se dvostruko povećao (110 kg/ha godišnje). **Bänziger i sur.** (2000.) navode nekoliko ključnih odrednica prinosa za kukuruz uzgajan u uvjetima abiotskog stresa uslijed nedostatka vode i niske opskrbljenosti tla dušikom, a to su sunčevo zračenje, dostupnost vode, dostupnost dušika, komponente prinosa (broj biljaka po hektaru, broj klipova po biljci, broj zrna po klipu i težina zrna) i tzv. *source-sink* odnos.

Duvick (2005.) navodi kako je za porast prinosa kukuruza u 20. stoljeću zaslužno nekoliko čimbenika, prvenstveno poboljšanje sustava gospodarenja usjevima te napredak u oplemenjivanju (korištenje hibrida i ostalo). U pregledu istraživanja o adaptaciji kukuruza na sušne uvjete **Araus i sur.** (2012.) navode kako se oko 75 % povećanja prinosa kukuruza u 20. stoljeću može pripisati genetičkim čimbenicima, a ostatak poboljšanom gospodarenju usjevima. Nadalje, genetička dobit nije bila povezana s povećanjem heterozisa, nego povećanjem tolerantnosti usjeva na stresne uvjete (**Duvick**, 1999.; **Tollenaar i sur.**, 2000.) povezanom s većom lisnom površinom po biljci i žetvenom indeksu (eng. *harvest index*, HI) (**Tollenaar i Lee**, 2006.). Dva ključna mehanizma vjerojatno su utjecala na ove parametre, a to su održavanje fotosinteze tijekom nalijevanja zrna (što povećava akumulaciju suhe tvari) te povećanje broja zrna. **Araus i sur.** (2012.) također navode ključne odrednice u stvaranju prinosa zrna i adaptaciji biljaka na sušne uvjete: 1) količina osvjetljenja, odnosno radijacije ($GY = RAD \cdot \%RI \cdot GLD \cdot RUE \cdot HI$), 2) dostupna voda ($GY = W \cdot WUE \cdot HI$), 3) održavanje klijanaca i rast biljke prije cvatnje, 4) cvatnja, 5) rast

listova i ASI, 6) svojstva koja upravljaju formiranjem zrna i 7) nalijevanje zrna i *stay green* svojstvo.

Kroz pokuse u gotovo tridesetogodišnjem razdoblju u 23 savezne države SAD-a i tri kanadske provincije **Assefa i sur.** (2017.) utvrdili su značajno povećanje prinosa u visokoprinosnim i vrlo visokoprinosnim okolinama. Isto tako, u navedenom području udio visokoprinosnih i vrlo visokoprinosnih okolina u razdoblju od 2007. do 2015. godine povećao se za 50 % u odnosu na razdoblje od 1987. do 1996. godine, što se može pripisati napretku u oplemenjivanju i daljnjem razvoju i ulaganjima u agronomске prakse pri proizvodnji kukuruza. **Assefa i sur.** (2018.) u sličnom su dugogodišnjem istraživanju zabilježili utjecaj gustoće sklopa na prinos od 8,5 - 17 % te utvrdili kako na povećanje prinosa osim gustoće sklopa utječu i poboljšanja samih komponenata prinosa.

U opsežnoj studiji o razvoju oplemenjivanja kukuruza **Andorf i sur.** (2019.) ističu sedam glavnih kategorija relevantnih za ovo područje istraživanja: 1) genomska analiza, 2) raznolikost i korištenje germplazme, 3) korištenje genetičke raznolikosti kroz transformacije i editiranje genoma, 4) razvoj inbred linija i sjemenska proizvodnja hibrida, 5) razumijevanje i predviđanje učinka hibrida, 6) metodologija oplemenjivanja i 7) sinteza prilika i izazova u budućnosti oplemenjivanja kukuruza.

U razdoblju od zadnjih 20-ak godina jedna od najvažnijih tema u agronomskim istraživanjima bile su klimatske promjene i njihov utjecaj na uzgoj kultunog bilja i proizvodnju hrane. **Lobell i sur.** (2014.) proveli su opsežno istraživanje (1995. - 2012.) o utjecaju klimatskih promjena, odnosno suše na prinos kukuruza te utvrdili povećanje osjetljivosti prinosa kukuruza na uvjete stresa uzrokovanog sušom povezanog s povišenim vrijednostima deficita tlaka para koji uvjetuje povišenu evapotranspiraciju biljaka. Koristeći različite klimatske modele **Li i sur.** (2022.) napravili su predviđanje o utjecaju globalnog zatopljenja na prinos i proizvodnju kukuruza. Nakon provedenih simulacija utvrdili su da bi uslijed globalnog zatopljenja i povećanja temperature od 2 °C prinos pao od 3 do gotovo 19 %, a pri povećanju od 1,5 °C od 6,8 do 7,2 %. Ova i mnoga druga istraživanja upozoravaju na utjecaj koji klimatske promjene imaju na proizvodnju i prinos najvažnijih svjetskih usjeva, među kojima je kukuruz na samom vrhu.

Kako su klimatske promjene sve više dolazile u prvi plan tako su se i problemi učinkovitog fenotipiziranja te objašnjavanja kompleksnih mehanizama genotipa i okoline u

agronomskim/genetičkim istraživanjima dodatno povećavali. Unatoč ogromnom napretku u genetici i genomici, rješavanje problema interakcije genotipa i okoline ostaje najveći izazov za znanstvenike i oplemenjivače (**van Eeuwijk i sur.**, 2016.), kao i učinkovita fenotipizacija, što uključuje tzv. visoku propusnost, odnosno generiranje većeg broja podataka u jedinici vremena (**Araus i Cairns**, 2014.; **Araus i sur.**, 2018.).

1.1.2. Indirektna selekcija kukuruza

U oplemenjivanju hibridnog kukuruza, najvažnija svojstva su prinos i vlaga zrna u berbi (**Troyer**, 1996.). Budući da se radi o kvantitativnim svojstvima niske heritabilnosti, cilj oplemenjivača je pronaći sekundarna svojstva koja daju dodatne informacije o stanju biljke i prinosu u određenoj okolini te omogućuju indirektnu selekciju za svojstva od interesa (**Lafitte i sur.**, 2003.). Da bi se mogla uspješno koristiti u selekciji, sekundarna svojstva trebaju biti genetički varijabilna, u korelaciji s prinosom, jednostavna i jeftina za mjerenje te imati visoku heritabilnost (**Lafitte i sur.**, 2003.; **Ziyomo i Bernardo**, 2013.; **Fellahi i sur.**, 2018.).

Opisujući sekundarna svojstva za povećanje tolerantnosti kultura na sušu **Edmeades i sur.** (1996.) navode kako takva svojstva trebaju biti genetički varijabilna i povezana s prinosom u ciljanim okolinama, visoko nasljedna, lagana za mjerenje, zabilježena za vrijeme ili prije cvatnje te biti dobar pokazatelj potencijala prinosa puno prije berbe. Autori nadalje navode sekundarna svojstva koja su se do tada proučavala u međunarodnom centru CIMMYT: ASI, izduživanje lista i stabljike, temperatura lišća, uvijanje listova, položaj listova, koncentracija klorofila u listu, tzv. *stay green* učinak, veličina metlice, osmotska koncentracija lista i polijeganje. Autori naglašavaju da bi odabir kombinacije sekundarnih svojstava u kombinaciji s prinosom mogao rezultirati bržim porastom i stabilnosti prinosa u sušnim uvjetima, u usporedbi s praćenjem samo prinosa kao glavnog svojstva, a tako usmjerena selekcija vjerojatno ne bi imala negativnih učinaka na prinos u okolinama s dovoljnom količinom vode. Nastavno na prethodna istraživanja **Edmeades i sur.** (1998.) navode koje bi elemente idealni tip sekundarnog svojstva trebao sadržavati (povezanost s prinosom u sušnim uvjetima, da ne utječe na prinos u normalnim uvjetima, visoka heritabilnost, niski troškovi i brzina mjerenja, stabilnost kroz vremenski period u kojemu se mjere, mogućnost mjerenja prije cvatnje).

Indirektna selekcija pokazala se kao korisna pa čak i ključna za uspjeh u oplemenjivanju na stresne okolinske čimbenike kao što su suša, nedostatak dušika i otpornost na razne bolesti (**Bänziger i Lafitte**, 1997.; **Bänziger i sur.**, 2000.; **Tembo i sur.**, 2016.). Oplemenjivači stoga u selekciji kukuruza koriste mnoga morfološka, fiziološka i biokemijska svojstva kako bi dodatnim informacijama stvorili potpuniju sliku cijelog procesa, uspješnije vodili svoje programe te na kraju razvili komercijalne inbred linije i hibride. Učinkovitost indirektna selekcije kod kukuruza proučavalo je više autora (**Chapman i Edmeades**, 1999.; **Zaidi i sur.**, 2007.; **Messmer i sur.**, 2009.; **Ertiro i sur.**, 2020.), a sekundarna svojstva koja su bila u fokusu istraživanja uključuju tolerantnost na sušu, višak vode u tlu, učinkovitost fotosinteze, nedostatak dušika u tlu, tolerantnost na hladnoću i mnoga druga.

Budući da postoji jaka pozitivna linearna veza između datuma cvatnje i prinosa zrna, datuma cvatnje i vlage zrna, i vlage zrna i prinosa zrna (**Lee i Tracy**, 2009.), najčešće korištena sekundarna svojstava u oplemenjivanju kukuruza su upravo svojstva vezana uz cvatnju kukuruza kao što su datum polinacije, datum svilanja te interval između polinacije i svilanja (ASI).

Međutim, stalna selekcija za specifična sekundarna svojstva mijenja ne samo njihovu prosječnu vrijednost, već također modificira njihovu temeljnu genetičku korelaciju s prinosom u poboljšanim populacijama (**McMillan i sur.**, 1995). Autori su ovakvim simulacijama pokazali kako promjena parametara vremenom može utjecati na selekciju. Isto tako, neki od simuliranih scenarija pokazuju kako upotreba početnih genetičkih vrijednosti bez promjena može imati potencijalno negativne učinke na genetičku dobit. Odnosi između sekundarnih svojstava i prinosa stoga zahtijevaju ponovnu procjenu tijekom vremena (**Edmeades i sur.**, 1996.).

Uslijed konstantnog povećavanja proizvodnje kukuruza, porasta stanovništva i klimatskih promjena oplemenjivanje kukuruza na tolerantnost prema sušnim uvjetima sve je veći imperativ (**Ribaut i sur.**, 2009.; **Harrison i sur.**, 2014.; **Malenica i sur.**, 2021.). Usmjerenje ciljeva selekcije na tolerantnost prema suši, implementacija rezultata u oplemenjivanju i proizvodnji predstavlja dugoročnu strategiju, a u nekim područjima i nužan uvjet uspješne proizvodnje.

Bolanos i Edmeades (1996.) proučavali su tolerantnost tropskog tipa kukuruzne germplazme na sušu preko mjerenja ASI i drugih pokazatelja poput broja klipova po biljci

i zrna po biljci. Rezultati su pokazali genetičku varijabilnost sekundarnih svojstava unutar elitnih populacija kukuruza. Korelacija između sekundarnih svojstava i prinosa bila je niska, što može upućivati na to da varijacije u prinosu kukuruza u stresnim uvjetima suše nastaju više zbog varijacija u procesima formiranja klipa povezanih s raspodjelom biomase u cvatnji nego zbog samog vodnog režima usjeva. Autori naglašavaju korisnost ovakvih rezultata za programe oplemenjivanja na tolerantnost prema suši.

U svome istraživanju **Chapman i Edmeades** (1999.) određivali su promjene prinosa i sekundarnih svojstava u ciklusima rekurentne selekcije za stres uvjetovan sušom u germplazmi kukuruza. Sekundarna svojstva korištena u ovome radu uključivala su broj klipova po biljci, broj zrna po klipu, broj zrna po kvadratnom metru, masu 1000 zrna, ASI, broj dana od sjetve do 50 % polinacije, visinu biljke, broj primarnih grančica metlice i senescencu lisne površine. Autori navode kako se varijabilnost germplazme kukuruza za sekundarna svojstva u stresnim okolinama redovito koristi u oplemenjivanju kukuruza.

Bänziger i sur. (2000.) predlažu broj klipova po biljci, ASI, senescenciju lista, veličinu metlice i uvrtnje listova kao svojstva za odabir poželjnih genotipova u programima oplemenjivanja na otpornost na sušu zbog njihove srednje do visoke heritabilnosti i srednje do visoke povezanosti s prinosom u stresnim uvjetima. Isto tako, autori navode tri glavne oplemenjivačke strategije u sušnim uvjetima: izbjegavanje suše preko selekcije ranih tipova germplazme, selekcija germplazme koja je tolerantna na varijacije u količini vode u različitim sezonama te selekcija germplazme s visokim potencijalom prinosa.

U analizi i pregledu molekularnih i fizioloških metoda i pristupa oplemenjivanju kukuruza za tolerantnost na sušne uvjete **Bruce i sur.** (2002.) navode niz genomičkih alata koji služe kako bi se steklo bolje razumijevanje mehanizama koji su u pozadini tolerantnosti elitne germplazme kukuruza na sušu.

U pregledu napretka u istraživanju i oplemenjivanju za tolerantnost kulturnog bilja na sušu **Cattivelli i sur.** (2008.) navode nekoliko glavnih pristupa koji bi omogućili dodatni napredak i ostvarivanje viših prinosa u stresnim okolinama: novi uvidi, metode i alati u biljnoj fiziologiji omogućili su bolje razumijevanje kompleksnih mehanizama svojstava vezanih uz tolerantnost na sušu; metodama molekularne genetike otkriveno je puno lokusa kvantitativnih svojstava (QTL) koji utječu na prinos u sušnim uvjetima ili ekspresiju

svojstava povezanih s tolerantnošću na sušne uvjete; napretkom u molekularnoj biologiji omogućeno je i veće korištenje transgenih metoda.

Monneveux i sur. (2008.) su pomoću sekundarnih svojstava kao što su broj isječaka po biljci, broj zrna po isječku, ASI, senescenca lista i uvijanje lista postigli značajan napredak u tolerantnosti na sušu kod dviju populacija kukuruza. Njihovi rezultati sugeriraju da je odnos između prinosa zrna i sekundarnih svojstava modificiran zbog kontinuirane selekcije u LPS i DTP populacijama. Neka ranije utvrđena sekundarna obilježja postala su manje važna, dok su druga postala relevantnija. Prosječna težina zrna, koja se prije nije koristila u okviru selekcijskog indeksa suše, bila je u snažnoj korelaciji s prinosom. Nadalje rezultati ove studije pokazuju da svojstva biljnih organa za fotosintezu marginalno doprinose otpornosti na sušu, dok je varijacija svojstava lista ili korijena manje važna od varijacije svojstava metlice. Autori navode kako bi se daljnji napredak u tolerantnosti kukuruza na sušu mogao ostvariti manipulacijom tzv. *sink* organa, što ukazuje na to da bi u bližoj budućnosti selekcija kukuruza za veći broj klipova, krupnije zrno i manju metlicu mogla pozitivno utjecati na povećanje prinosa u sušnim uvjetima.

Araus i sur. (2012.) navode niz sekundarnih svojstava kojima bi se mogla poboljšati stabilnost prinosa u sušnim uvjetima: ASI, količina svile na klipu, prag rasta biljke vezano uz formiranje klipa, prag veličine klipa vezano uz rast svile i broj zrna, odgovarajuća dostupnost peluda, broj klipova po biljci, broj zrna po klipu, težina zrna, stupanj propadanja zrna u prvih pet dana nakon polinacije i tzv. *stay green* svojstvo. Autori napominju kako je suša za vrijeme cvatnje daleko važnija nego suša u ranijim dijelovima vegetacije, stoga svojstva vezana uz povećanja produktivnosti biljke postaju važnija tijekom cvatnje i nalijevanja zrna.

Ziyomo i Bernardo (2013.) utvrđivali su heritabilnost, genetičku varijancu i genetičke korelacije za prinos zrna i sekundarna svojstava kukuruza u sušnim uvjetima te efikasnost indirektna selekcije preko sekundarnih svojstava (ASI, senescencija lista, sadržaj klorofila u listu) u uvjetima suše u usporedbi s genomskom selekcijom. Prosječni prinos u sušnim uvjetima iznosio je 52 % u odnosu na kontrolu, a heritabilnost za prinos iznosila je 0,37 u sušnim uvjetima, a 0,60 u kontroli. Uspoređujući direktnu i indirektnu selekciju za prinos u sušnim uvjetima autori su zaključili da indirektna selekcija preko sekundarnih svojstava nije bila učinkovitija od direktne selekcije za prinos u sušnim uvjetima. U konačnici autori

zaključuju kako bi genomska selekcija mogla povećati genetičku dobit za prinos u sušnim uvjetima u jedinici vremena.

Ističući abiotске stresove poput suše i vrućine kao prijetnju globalnoj proizvodnji usjeva i sigurnosti hrane **Fahad i sur.** (2017.) navode morfološke, fiziološke i biokemijske reakcije biljaka na stres uzrokovan sušnim i/ili vrućim uvjetima kao presudne za uspješno gospodarenje usjevima te opisuju mnogobrojne konvencionalne i moderne pristupe koji bi to mogli omogućiti. Kao morfološke pokazatelje naveli su rast biljke i prinos zrna, kao fiziološke pokazatelje odnose biljke s vodom i hranivima, fotosintezu, raspodjelu asimilata, a kao biokemijske pokazatelje oksidacijski gubitak (eng. *oxidative damage*) kao sljedeću neizbježnu fazu kod većine kulturnih biljaka koje budu pogođene raznim abiotским stresovima. Kao moguća rješenja autori navode klasično i moderno oplemenjivanje bilja, korištenje transgenih kultivara, induciranje otpornosti na stres upotrebom regulatora rasta i drugim metodama tijekom različitih faza razvoja biljke.

Dušik je jedno od najvažnijih biljnih hraniva i dio širokog spektra kemijskih spojeva u metabolizmu biljke koji imaju ključne uloge u fotosintetskoj aktivnosti, odnosno rastu i razvoju biljke te postizanju visokih prinosa (**Gheith i sur.**, 2022.).

Bänziger i Lafitte (1997.) ispitivali su mogućnost povećanja efikasnosti selekcije u okolinama siromašnim dušikom pomoću sekundarnih svojstava. Genetičke korelacije sekundarnih svojstava s prinosom bile su u prosjeku -0,47 za ASI, 0,78 za broj klipova po biljci, 0,24 za koncentraciju klorofila u listu i 0,42 za senescencu lista. Efikasnost selekcije povećala se za 14 % u odnosu na direktnu selekciju samo na visinu prinosa zrna kada su se informacije o svim navedenim svojstvima kombinirale u Smith-Hazelov indeks.

Bänziger i sur. (2000.) navode sekundarna svojstva preko kojih se može odrediti koja germplazma sadrži tolerantnost na niske razine dušika u tlu: broj klipova po biljci, senescencija lista i ASI te ističu korištenje selekcijskih indeksa kojima se kombiniraju informacije o sekundarnim svojstvima s prinosom zrna, kao i različite oplemenjivačke strategije kojima bi se razvila germplazma tolerantna na uvjete abiotskog stresa uzrokovanog sušom i nedostatkom dušika.

Polazeći od pretpostavke da bi gnojidba manjim količinama dušika mogla postati cilj selekcije kukuruza u okviru sustava održive poljoprivrede **Gallais i sur.** (2008.)

uspoređivali su uspješnost izravne i neizravne selekcije kod populacija kukuruza ovisno o opskrbljenosti dušikom (izravna selekcija pri niskoj razini dušika i neizravna pri visokoj razini dušika). Rezultati su pokazali veću učinkovitost neizravne selekcije koja je imala veće vrijednosti heritabilnosti i niže vrijednosti okolinske varijance i interakcije genotipa i okoline.

Ističući prisutnost i značaj klimatskih promjena u novijem razdoblju proizvodnje usjeva **Jung i Muller** (2009.) naglašavaju kako je jedan od najvažnijih ciljeva oplemenjivanja bilja pomicanje vremena cvatnje i oplodnje. Autori navode glavne regulacijske mehanizme cvtanje i predlažu nove strategije kojima bi se moglo utjecati na promjenu cvatnje kod kulturnog bilja. Usmjeravanje selekcije kukuruza na ranozrelost predstavlja važno sekundarno svojstvo pomoću kojega bi se razvila germplazma kraće vegetacije koja vremenom cvatnje može bolje odgovoriti na abiotški stres, odnosno izbjeći scenarij u kojemu se cvatnja odvija u vrijeme najvećih vrućina i nedostatka vode.

Procjenjujući utjecaj bolesti na svojstva klipa kukuruza **Tembo i sur.** (2016.) u svojim su istraživanjima zaključili kako se indirektna selekcija pomoću agronomskih svojstava za tolerantnost na bolesti *Stenocarpella maydis* i *Fusarium graminearum* može koristiti kao dodatni alat u selekciji visoko prinasnih i otpornih hibrida kukuruza. Autori preporučuju korištenje svojstava poput pokrivenosti klipa komušinom, opadanja klipa i teksture zrna u indirektnoj selekciji za tolerantnost na bolesti kao nešto što bi moglo doprinijeti direktnoj selekciji, a ne u potpunosti je zamijeniti.

Nascimento-Júnior i sur. (2018.) ispitali su mogućnost korištenja indirektne selekcije preko anatomskih i agronomskih svojstava korijena populacija kukuruza. Agronomska svojstva koja su bila uključena u istraživanje su visina biljke, visina klipa, pozicija klipa, polijeganje stabljike, pucanje stabljike i prinos zrna, dok su anatomska svojstva bila površina korijena, površina središnjeg cilindra, debljina epiderme, debljina egzoderme, debljina endoderme, debljina kortikalnog parenhima, broj metaksilemskih vodova, površina floema, debljina korteksa i površina metaksilema. Analiza genotipskih korelacija pokazala je povezanost sljedećih svojstava: debljina endoderme s visinom biljke, debljina egzoderme s pucanjem stabljike i prinosom zrna. Ovi i drugi rezultati iz ove studije upućuju na to da bi se pomoću anatomskih svojstava korijena u ranim razvojnim fazama mogla koristiti indirektna selekcija.

Vezano uz učinkovito mjerenje svojstava kulturnog bilja u pregledu fenotipizacijskih metoda i opisivanje implementacije fenotipizacije visoke propusnosti (eng. *high-throughput phenotyping*, HTP) **Araus i sur.** (2018.) napominju kako je nemogućnost upotrebe metoda HTP ključna komponenta koja ograničava genetičku dobit u oplemenjivačkim programima. Isto tako, autori ističu kako je potrebno fenotipizaciju staviti u širi kontekst te kako učinkovito premostiti jaz između oplemenjivača i fenotipizatora.

Prema **Parajuli i sur.** (2018.) upotreba sekundarnih svojstava poput uvijanja listova, senescencije listova, ASI i temperature lišća u oplemenjivačkim programima korisna je metoda za odabir najboljih genotipova u stresnim uvjetima nedostatka vode i niskim razinama dušika. U svome istraživanju autori su potvrdili kako sekundarna svojstva ne utječu izravno na prinos u stresnim uvjetima, ali ih se može koristiti kao dodatnu metodu za odabir tolerantnih genotipova.

Galić i sur. (2019.b) istraživali su čimbenike povezane s genomičkom preciznošću predviđanja visine za visine biljaka sijane u dvije gustoće na test križancima IBM populacija kukuruza. Zaključili su da se veličina populacije koja se mapira može održati malom odgovarajućim odabirom uz održavanje visoke točnosti genomičkog predviđanja. Isto tako, autori navode kako je indirektna selekcija uz pomoć PI_{ABS} učinkovitija od genomičke selekcije u uvjetima umjereno vrućeg scenarija.

Kamphorst i sur. (2020.) su pomoću višestruke regresije nastojali identificirati svojstva koja bi mogla pridonijeti poboljšanju agronomskih svojstava kukuruza kokičara u uvjetima nedostatka vode. Osim lisnog zelenila (SPAD indeks), svojstva povezana s fotosintetskim aparatom biljke i provodljivost puči pokazali su se dobrim indikatorima agronomskih svojstava kokičara u sušnim uvjetima.

1.1.3. Uporaba fluorescencije u indirektnoj selekciji kukuruza

Analiza fluorescencije klorofila jedna je od najmoćnijih i najraširenijih tehnika za proučavanje utjecaja stresa na proces fotosinteze. Od prve upotrebe, omjer F_v/F_m uvelike se koristio kao osjetljiv pokazatelj fotosintetske učinkovitosti biljaka. Smanjenje ovog indeksa ukazuje na smanjenje učinkovitosti fotosustava II, odnosno fotoinhibiciju. U

zadnjih dvadesetak godina primjena fluorescencije klorofila uvelike je napredovala, a uspostavljeni su i mnogi drugi informativni parametri za otkrivanje fotokemijske učinkovitosti PSII i raspodjele svjetlosne energije na alternativne disipativne mehanizme (**Guidi i sur.**, 2019.).

Naglašavajući važnost spektroskopije fluorescencije **Strasser** (2000.) navodi kako su se nakon primjene mnogih tehnika mjerenja fluorescencije održale dvije glavne: izravna fluorescencija i modulirana fluorescencija. Nadalje, autor navodi prednosti izravne fluorescencije u odnosu na moduliranu: puno više informacija za vrijeme trajanja mjerenja, veća neovisnost pri radu u polju, veliki broj testiranih uzoraka (100 - 300 uzoraka po satu), generiranje podataka u svim vremenskim uvjetima, mala masa, više nego upola jeftinije od bilo kojeg moduliranog sustava. Autor zaključuje kako je osnovno razumijevanje fluorescencije u kombinaciji s JIP-testom dovoljan alat za analizu bilo kojeg biljnog materijala u bilo kojoj situaciji, čak i za osobe koje nisu specijalizirane za mjerenje fluorescencije. Navodeći toleranciju usjeva na stresne uvjete kao glavni cilj istraživanja i oplemenjivačkih programa **Brestic i Zivcak** (2013.) napravili su pregled metoda i primjena mjerenja fluorescence fotosustava II kod kulturnog bilja u uvjetima suše i visoke temperature, usmjeravajući se na praktične aspekte, protokole i primjene, odnosno na biljne ekofiziologe, biologe i oplemenjivače koji bi fluorescenciju klorofila koristili kao alat u svojim istraživanjima. Autori navode kako su najčešće metode mjerenja fluorescencije metoda izravnog mjerenja (instrumenti na LED osnovi) koju karakterizira brzo mjerenje klorofila *a* (**Strasser i Govindjee**, 1991.; 1992.) te analiza saturacijskog impulsa koju karakterizira uporaba fluorometrije modulacijom impulsa i amplitude (*pulse-amplitude modulation*, PAM) (**Schreiber i sur.**, 1986.; **Schreiber**, 2004.). Još neke metode koje daju rezultate slične PAM fluorometriji su tzv. *pump and probe* fluorometrija (**Mauzerall** 1972.; **Falkowski i sur.**, 1986.), fluorometrija brzim ponavljanjima (*fast repetition rate*, FRR, **Kolber i sur.**, 1998.) te PDP fluorometrija (*pump during probe*, **Olson i sur.**, 1996.). U nastavku rada autori **Brestic i Zivcak** (2013.) detaljno opisuju uporabu PAM fluorometrije kao najvažnije metode te navode prednosti i nedostatke mjernih protokola pri korištenju iste. Isto tako, navode i ključne parametre fluorescencije klorofila pri fenotipizaciji u stresu uzrokovanom sušom i visokom temperaturom kod kukuruza te zaključuju kako je korištenje fluorescencije koristan alat za fenotipizaciju oplemenjivačima.

Fluorescencija klorofila vjerojatno je jedna od najčešće korištenih ekofizioloških tehnika za proučavanje procesa fotosinteze u biljkama (**Murchie i Lawson**, 2013.), što dokazuje veliki broj neinvazivnih i prijenosnih fluorometara za klorofil koji su danas dostupni. Međutim, unatoč jednostavnosti korištenja klorofilnih fluorometara, teorija i interpretacija podataka koji proizlaze iz mjerenja fluorescencije klorofila još uvijek predstavljaju kompleksno područje. Mnoge recenzije navode teoretsku pozadinu analize fluorescencije klorofila, a veliki broj istraživanja govori o korištenju ove metodologije za pružanje informacija i objašnjavanje fizioloških mehanizama povezanih s procesom fotosinteze (**Maxwell i Johnson**, 2000.; **Baker**, 2008.; **Guidi i Calatayud**, 2014.; **Kalaji i sur.**, 2014., 2017.; **Guo i Tan**, 2015.; **Ruban**, 2016.; **Stirbet i sur.**, 2018.).

Fotosustav II komponenta je tilakoidnih membrana kloroplasta koja je najosjetljivija na oštećenje. Stoga je glavni rezultat abiotskog stresa učiniti PSII sklonim fotoinhibiciji (**Nishiyama i sur.**, 2006.). Nasuprot tome, PSI ima vrlo učinkovit zaštitni mehanizam koji može spriječiti fotoinhibiciju te rjeđe dolazi do oštećenja (**Gururani i sur.**, 2015.). Fotoinhibicija PSI događa se kada opskrba elektronima iz PSII premaši njegovu sposobnost prihvatanja elektrona (**Tikkanen i Grebe**, 2018).

Prvi važan parametar izveden iz Kautskyjeve krivulje bio je omjer F_v/F_m (**Krause**, 1988.), a kasnije je postao ključni parametar za otkrivanje fotoinhibicije PSII izazvane faktorom stresa (**Krause i Weis**, 1991.). Ovaj omjer naziva se maksimalni kvantni prinos (eng. *maximum quantum yield*) fotosustava II i jedan je od najviše korištenih parametara pri mjerenju fluorescencije klorofila *a*. Da bi se odredio ovaj omjer, primjenjuje se slaba modulirana mjerna zraka za određivanje minimalnog prinosa fluorescencije u listu prilagođenom na tamu (F_0), a zatim se superponira zasićeni bljesak kako bi se inducirao maksimalni prinos fluorescencije klorofila (F_m). Omjer F_v/F_m [$(F_m - F_0)/F_m$] predstavlja procjenu maksimalne fotokemijske učinkovitosti PSII i koristi se za otkrivanje gubitka funkcije reakcijskih centara PSII (**Öquist et al.**, 1992). Vrijednosti F_v/F_m obično se kreću između 0,75 i 0,85, a taj je omjer proporcionalan kvantnom prinosu fotokemije (**Kitajima i Butler**, 1975.).

Pad ovog omjera smatra se dobrim pokazateljem fotoinhibicije koja može proizaći iz dva različita procesa (**Öquist et al.**, 1992.): smanjenja konstante brzine fotokemije PSII uzrokovanog oštećenjima reakcijskih centara PSII i/ili povećanje konstante brzine neradijacijske disipacije energije pobude. Smanjenje konstante brzine za fotokemiju PSII

dovodi do povećanja početne fluorescencije na otvorenim klopama PSII (F0), dok povećanje konstante brzine neradijacijske disipacije energije dovodi do smanjenja početne fluorescencije (F0) i maksimalne fluorescencije na zatvorenim klopama PSII (Fm) (**Kitajima i Butler**, 1975). Međutim, ponekad smanjenje omjera Fv/Fm nije linearno povezano s količinom inaktiviranih reakcijskih centara PSII (**Park i sur.**, 1996). Vrijedno je naglasiti da se omjer Fv/Fm ponekad pogrešno smatra pokazateljem fotoinaktivacije PSII, ali taj se omjer smanjuje ne samo zbog zatvaranja reakcijskih centara PSII, već i kada se drugi procesi natječu s odvajanjem naboja kao što je kao toplinska disipacija apsorbirane svjetlosti (**Malnoë**, 2018), kao što je detaljno navedeno u nastavku.

Fotosintetička aktivnost dobar je pokazatelj ukupnog stanja biljke jer je jedan od prvih odgovora biljke na nepovoljne okolinske uvjete pad fotosintetske aktivnosti. Fluorescencija klorofila *a* proučava se u laboratorijima dugi niz godina s ciljem boljeg razumijevanja funkcioniranja fotosintetskog aparata kao jednoga od ključnih generatora ukupnog prinosa biljke. Ograničavajući čimbenik kod fenotipizacije nekog svojstva često je vrijeme potrebno za prikupljanje i obradu podataka. Nemogućnost učinkovite implementacije metoda fenotipizacije visoke propusnosti sve se više doživljava kao ključna komponenta koja ograničava genetičku dobit u oplemenjivačkim programima (**Araus i Cairns**, 2014.; **Araus i sur.**, 2018.).

Prednost mjerenja brze fluorescencije i analize emitiranih tranzijenata u odnosu na druge metode očituje se u mogućnosti brzog i jednostavnog dobivanja velikog broja podataka koji govore o fiziološkim i fotokemijskim svojstvima biljke (**Galić i sur.**, 2019a), **Bussotti i sur.**, 2020.). Razvoj pristupačnih mjernih uređaja koji omogućuju brzo dobivanje podataka bez uništavanja biljnog materijala, kao i matematičkih modela i parametara kojima se interpretiraju rezultati mjerenja, učinio je ovu metodu pristupačnom znanstvenicima iz različitih područja djelovanja, prvenstveno fiziolozima bilja u proučavanju reakcije biljaka na stresne uvjete (**Fracheboud i Leipner**, 2003.). Osim toga, ova metoda je nedestruktivna, a parametri JIP-testa opisuju događaje vezane uz apsorpciju svjetlosti (ABS), hvatanje energije (TR), transport elektrona (ET), disipaciju (D) i redukciju krajnjeg primatelja elektrona (RE). Ovi su procesi izraženi kroz parametre poput *specifičnih* i *fenomenoloških* protoka energije, prinosa (odnosno efikasnosti), frakcija reakcijskih centara fotosustava II i drugih (**Strasser i sur.**, 2000., 2004.).

Malo je radova u kojima su parametri fluorescencije klorofila *a* korišteni kao selekcijski alat u oplemenjivanju (**Fracheboud i sur.**, 1999.; **Kalaji i sur.**, 2017.), stoga veza između parametara fluorescencije klorofila i prinosa u poljskim uvjetima uzgoja nije u potpunosti razjašnjena (**Galić i sur.**, 2019.a), iako se metode mjerenja fluorescencije koriste za određivanje i predviđanje prinosa u raznim proizvodnim regijama u svijetu. **Fracheboud i sur.** (1999.) istraživali su mogućnost korištenja analize specifičnog procesa (eng. *quenching*) fluorescencije klorofila *a* kao alata za odabir kukuruza poboljšane tolerancije na niske temperature kod genotipova različitog podrijetla te dokazali da je ta metoda učinkoviti selekcijski alat za poboljšanje tolerancije na niske temperature kod uzgoja kukuruza. U različitim stresnim uvjetima, kao što su suša, niske temperature ili niska opskrba dušikom, efikasnost fotosinteze veća je kod novijih hibrida u odnosu na starije što omogućuje bolji odgovor biljaka na stresne uvjete (**Duvick**, 2005.).

Istražujući utjecaj nedostatka vode na hibride kukuruza **O'Neill i sur.** (2006.) su uz pomoć parametara fluorescencije (kvatna učinkovitost PSII, udio transporta elektrona) procjenjivali toleratnost dvanaest hibrida kukuruza na razne varijante nedostatka vode u četverogodišnjem razdoblju na lokaciji u američkoj saveznoj državi Nebraski. Autori su zaključili kako se tehnika mjerenja fluorescencije klorofila može uspješno primjenjivati u procjenjivanju tolerantnosti hibrida u uvjetima nedostatka vode. Ispitivanja tolerantnosti germplazme kukuruza na sušu preko mjerenja fotosintetske učinkovitosti bila su u fokusu mnogih istraživačkih skupina.

U pregledu istraživanja o utjecaju vodnog stresa na fotosintezu kod C_4 biljaka **Ghannoum** (2009.) ističe kako su biljke sa C_4 tipom fotosinteze visoko osjetljive na stres uzrokovan nedostatkom vode. Smanjivanjem sadržaja vode u listu asimilacija CO_2 i provodljivost puči brzo opadaju što značajno utječe na proces fotosinteze. Autor navodi fotosintetske mehanizme koji objašnjavaju kako se C_4 biljka nosi s nedostatkom vode.

Lepeduš i sur. (2012.) analizirali su genetičku varijabilnost i detektirali potencijalne lokuse kvantitativnih svojstava (QTL) za dva parametra fluorescencije klorofila *a* kod IBM mapirajuće populacije kukuruza u dvije okoline koje su se razlikovale u opskrbljenosti vodom. **Franić i sur.** (2017.) istraživali su utjecaj kombinacije vodnog stresa i stresa uzrokovanog kadmijem na fotosintetsku aktivnost kukuruza pomoću fluorescencije klorofila *a*. Analiza agronomskih svojstava kukuruza pomoću mjerenja fluorescence predstavlja dobar izvor dodatnih informacija o prinosu i ostalim važnim svojstvima u

selekciji kukuruza (**Franić i sur.**, 2015.; **Galić i sur.**, 2019.a; **Franić i sur.**, 2019.; **Galić i sur.**, 2020.).

Chen i sur. (2019.) zaključuju da je korištenje tzv. solarno inducirane fluorescencije (eng. *solar-induced fluorescence*, SIF) za praćenje prinosa u sušnim uvjetima pouzdanije od drugih korištenih metoda.

Navodeći povišene temperature uzrokovane globalnim zagrijavanjem kao prijetnju poljoprivrednoj proizvodnji **Hu i sur.** (2020.) ističu kako je nakon zadnjih nekoliko desetljeća istraživanja utvrđeno da su kloroplasti visoko osjetljivi na stres uzrokovan visokim temperaturama. Visoke temperature mogu negativno utjecati na niz fotosintetskih procesa uključujući i biosintezu klorofila, fotokemijske reakcije, transport elektrona i asimilaciju CO₂. Autori također navode važan napredak u istraživanjima te kako svojstva kloroplasta kao glavnih fotosintetskih organela doprinose tolerantnosti biljaka na stres uzrokovan visokima temperaturama.

Bussotti i sur. (2020.) proučavali su odnose između parametara JIP-testa s ciljem odabira onih koji najbolje obuhvaćaju varijabilnost fotosintetske učinkovitosti i odgovore na vanjske utjecaje. Rezultati analize glavnih komponenata (PC) pokazali su da je varijabilnost parametara fluorescencije najvećim dijelom objašnjena s dva faktora povezana s procesima hvatanja fotona i prvim fotokemijskim događajima te s efikasnosti transporta elektrona oko fotosustava I.

U istraživanju koje su proveli **Wang i sur.** (2023.b) autori su pomoću SIF, vegetacijskih indeksa, meteoroloških podataka i podataka o tlu za razdoblje od 2000. do 2009. godine napravili predviđanje prinosa kukuruza u normalnim i sušnim godinama u kineskoj provinciji Hebei. Njihovi rezultati također su pokazali da je SIF bolji prediktor za prinos kukuruza u sušnim uvjetima od ostalih korištenih parametara.

Istraživanja učinaka raznih okolinskih čimbenika poput suše, visokih temperatura, saliniteta i toksičnosti teških metala u tlu na rast i razvoj kukuruza pomoću fluorescencije klorofila *a* na Poljoprivrednom institutu Osijek (PIO) odvijaju se od 2009. godine kada je skupina autora (**Lepeduš i sur.**, 2012.) napravila uvodno istraživanje kako bi utvrdili razlike između inbred linija u tipu tvrdunaca i zubana iz različitih heterotičnih skupina. Fluorescencija je mjerena u polju tijekom svilanja, a podatci su iskorišteni za

izračunavanje dva parametra koji opisuju fotokemiju fotosustava II, a to su omjer F_v/F_m i indeks učinkovitosti na bazi apsorpcije (PI_{ABS}). Za oba parametra utvrđene su značajne razlike među inbred linijama, s time da su razlike u fotosintetskoj učinkovitosti bile izraženije među inbred linijama u tipu zubana nego između zubana i tvrdunaca. Poznate inbred linije B73 (heterotična skupina Iowa Stiff Stalk Synthetic) i Mo17 (heterotična skupina Lancaster) značajno su se razlikovale za oba fotosintetska parametra u scenariju suše, što znači da predstavljaju odgovarajuće roditeljske komponente za stvaranje mapirajuće populacije kao izvora za buduće studije.

U daljnjim istraživanjima skupina sutora (Šimić i sur., 2014.) napravila je QTL analizu za devet parametara JIP-testa kod kukuruza za vrijeme cvatnje u četiri okoline na lokaciji Osijek (dvije okoline u 2010. godini, jedna u 2011. i jedna u 2012.). Na osnovu prijašnjeg istraživanja (Lepeduš i sur., 2012.) za ovu analizu odabrane su linije B73 i Mo17 – korišteno je 205 međusobno križanih inbred linija (eng. *intermated recombinant inbred lines*, IRIL) biparentalne populacije (*intermated* B73 × Mo17, IBM; Lee i sur., 2002.) te obje roditeljske linije. U 2010. godini dvije roditeljske inbred linije značajno su se razlikovale po parametrima fluorescencije u vrlo sušnim uvjetima, što upućuje na to da se fluorescencija klorofila može koristiti kao učinkovita metoda za ispitivanje germplazme u raznim scenarijima suše. Sljedeće godine rezultati QTL analize s 2.178 molekularnih markera iz cijeloga genoma pokazali su 10 značajnih lokusa na prvom, petom, sedmom i osmom kromosomu za sedam parametara JIP-testa, od kojih se pet lokusa isticalo nakon kombinirane analize svih okolina što ukazuje na poligenско nasljeđivanje i pleiotropiju. Jedan pleiotropni lokus, koji je utvrđen na sedmom kromosomu, podudara se s genom *gst23* koji bi mogao biti povezan s učinkovitim vršenjem fotosinteze u raznim scenarijima na polju.

Franić i sur. (2015.) ispitivali su utjecaj gustoće sjetve na prinos i ostala agronomska svojstva i fotosintetičku učinkovitost (eng. *performance index*, PI). Korišteno je 80 rekombinantnih IBM linija koje su posijane u dvije različite gustoće sjetve 2013. godine. Rezultati su pokazali kako je povećanje gustoće sklopa s 57 000 biljaka po hektaru na 95 000 biljaka po hektaru rezultiralo nižim vrijednostima svih mjerenih parametara, uključujući prinos zrna i indeks učinkovitosti fotosinteze. Korelacija između ova dva svojstva bila je statistički značajna i slaba ($r = 0.36$). Niže vrijednosti PI u uvjetima gušćeg sklopa ukazuje na to da su biljke bile pod stresom uslijed međusobnog zasjenjivanja, što

uzrokuje smanjivanje aktivnosti fotosinteze i veću kompeticiju biljaka za vodom i hranivima (**Marchiori i sur.**, 2014.). Prinos po biljci u gušćem sklopu bio je niži, ali po jedinici površine viši zbog većeg ukupnog broja biljaka po hektaru. Ovi rezultati podudaraju se s istraživanjem **Gonzala i sur.** (2010.), koji su ispitali utjecaj gustoće sklopa na 186 rekombinantnih IBM linija. Smanjivanje vrijednosti PI, kao i ostalih parametara, ukazuje na to da se pomoću PI može odrediti stres uzrokovan različitom gustoćom sjetve.

Ispitivanja germplazme kukuruza uz pomoć fotosintetičkih parametara nastavila su se istraživanjem skupine autora (**Franić i sur.**, 2017.), koji su procjenjivali utjecaj viška kadmija u tlu mjerenjem fotosintetičke i biokemijske aktivnosti biljaka. Ispitivana germplazma uključivala je dvije inbred linije iz heterotičnih skupina BSSS i Lancaster (B84 i Os 6-2) s različitom osjetljivošću na kadmij te njihov međusobni hibrid. Rezultati su potvrdili veću osjetljivost linije B84 na stres uzrokovan viškom kadmija, a kod ispitivanog hibrida biokemijskim parametrima detektirana je nikakva ili slaba razina stresa, dok je korištenjem fotosintetičkih parametara stres bio detektiran iako manjeg intenziteta nego kod osjetljive linije.

Koristeći parametre fluorescencije klorofila *a* **Franić i sur.** (2019.) ispitali su utjecaj temperature i manjak osvjetljenja na fotosintezu kod hibrida kukuruza. Parametri JIP testa uključivali su parametre tranzijenta fluorescencije, kvantni prinos, transport elektrona po reakcijskom centru te indeks učinkovitosti. Pet hibrida kukuruza Poljoprivrednog instituta Osijek (OS 378, Drava 404, OSSK 444, OS 505 i Velimir) bilo je podvrgnuto različitim tretmanima (manjak osvjetljenja, hladnoća, vrućina, ekstremna vrućina) te uspoređeno s kontrolnim tretmanom i poljskim uvjetima. Utvrđene su značajne razlike između kontrole i svih ostalih tretmana za sve korištene parametre. Efikasnost iskorištenja fotokemijske energije bila je najniža u uvjetima ekstremne vrućine, dok je analiza glavnih komponenata (PCA) generirala informacije o različitim fotokemijskim procesima, olakšavajući tako klasifikaciju raznih stresnih utjecaja prema njihovom učinku na fluorescenciju klorofila *a*. Autori potvrđuju kako je potrebno više istraživanja o upotrebi fluorescencije u oplemenjivanju kukuruza jer je to metoda koja je lagana za mjerenje, a generira puno podataka, što onda dopunjuje potreban biološki okvir za objašnjavanje mehanizama reakcija biljaka na stres.

Udio teških metala u tlu i njihova akumulacija u vegetativnim dijelovima biljke važan je dio istraživanja u području fiziologije kukuruza. **Franić i sur.** (2020.) ispitivali su pomoću mjerenja fluorescencije klorofila *a* varijabilnost sadržaja kadmija u listovima kukuruza te utjecaj kadmija na proces fotosinteze. U dvogodišnjim pokusima koristile su se četiri inbred linije kukuruza (B73, Mo17, B84 i Os 6-2) na kojima je mjerena fluorescencija i fotosintetski pigmenti (klorofil *a*, klorofil *b*, karotenoidi) te ICP-OES analiza za određivanje sadržaja kadmija i cinka u listovima. Utvrđene su značajne razlike između genotipova za koncentraciju kadmija u listovima, a promjene u fluorescenciji klorofila uslijed povišenih koncentracija kadmija u tlu bile su vidljive kao promjene u energiji disipacije, prinosu fotosustava II i transportu elektrona. Smanjivanje vrijednosti parametara fluorescencije upućuje na reduciranu učinkovitost reakcijskih centara i probleme s ponovnom oksidacijom primarnog kinonskog akceptora.

Procjenjujući genetičke korelacije između fotosinteze i prinosa zrna kukuruza pri različitim temperaturnim scenarijima **Galić i sur.** (2019.a) koristili su 221 rekombinantnu IBM liniju (IBMSyn4 IRILs) te isti broj njihovih test križanaca s elitnom linijom iz heterotične skupine Iodent Poljoprivrednog instituta Osijek. Križanci su ispitivani u šest okolina na dvije lokacije u Hrvatskoj i Turskoj kroz tri godine, a ovisno o geografskoj regiji postavljena su i dva temperaturna scenarija (blagi i umjereno vrući). Razlike između scenarija najviše su se isticale kroz efikasnost transporta elektrona, indeks učinkovitosti (PI_{ABS}) i prinos zrna. U uvjetima umjereno vrućeg scenarija utvrđene su pozitivne genetičke korelacije između fotosintetskog parametra $ET/(TR-ET)$ i prinosa zrna (0,73), kao i između PI_{ABS} i prinosa zrna (0,59). Korelacije između svojstava bile su znatno slabije u uvjetima blagog scenarija. Iako je indirektna selekcija preko parametara fluorescencije manje učinkovita od direktne selekcije, $ET/(TR-ET)$ i PI_{ABS} mogli bi biti učinkoviti parametri u oplemenjivanju u uvjetima umjereno vrućeg scenarija uzevši u obzir njihovu genetičku korelaciju s prinosom u stresnim okolinama. Isto tako, autori zaključuju kako je indirektna selekcija preko PI_{ABS} učinkovitija od genomičke selekcije u uvjetima umjereno vrućeg scenarija.

Upotreba fluorescencije klorofila i dalje je aktualan alat za određivanje reakcije biljaka na stres uzrokovan nedostatkom vode i visokim temperaturama, a vrlo vjerojatno moći će se koristiti i u novijim istraživanjima kako bi se dodatno rasvijetlila kompleksna problematika utjecaja abiotičkih stresova na kukuruz i ostale kulturne biljke.

1.2. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi postoji li genetička varijabilnost u svojstvima fluorescencije klorofila a u setu eksperimentalnih i komercijalnih hibrida kukuruza.
2. Utvrditi postojanje genetičkih korelacija između svojstava fluorescencije klorofila a i agronomskih svojstava kukuruza, te strukturu varijance navedenih varijabli.
3. Izraditi penalizirani regresijski model sa svojstvima fluorescencije klorofila a kao prediktorima i agronomskim svojstvima kao zavisnim varijablama, te istražiti strukturu varijance i heritabilnosti ostvarenih predviđanja.
4. Procijeniti efikasnost posredne selekcije korištenjem vrijednosti predviđenih penaliziranim regresijskim modelom s efikasnosti izravne selekcije.

Glavne hipoteze ovog istraživanja su da postoji genetička varijabilnost u svojstvima fluorescencije klorofila a , te da su ta svojstva genetički korelirana s prinosom i vlagom zrna. Nadalje, pretpostavka je da je korištenjem svojstava fluorescencije klorofila a moguće predvidjeti prinos i vlagu zrna u cvatnji korištenjem penaliziranog regresijskog modela čime bi se omogućilo planiranje križanja za vrijeme sezone, te izbor najboljih potomstava što bi omogućilo efikasnije korištenje resursa i skraćivanje ciklusa dobivanja novih hibrida.

2. MATERIJAL I METODE RADA

2.1. Biljni materijal i dizajn pokusa

Pokus je postavljen na površinama Poljoprivrednog instituta Osijek (PIO) u Osijeku 2017., 2018. i 2019. godine. Korišteno je 16 hibrida iz FAO 400 skupine zriobe od čega 14 hibrida Poljoprivrednog instituta Osijek (PIO), te dva strana, komercijalno dostupna standarda. Popis hibrida, identifikacijske oznake i pedigree prikazani su u **Tablici 1**. Skupina FAO 400 odabrana je kao komercijalno najznačajnija skupina zriobe u Republici Hrvatskoj.

Tablica 1. Identifikacijske oznake, imena, te pedigree hibrida korištenih za postavljanje pokusa

Oznaka	Hibrid	♀ roditelj	♂ roditelj
H1	PIO1	OSL111	OS5077
H2	PIO2	OS KULAK	
H3	PIO3	OS23-48	OSTM9
H4	PIO4	OS7216	OS5126J40
H5	PIO5	OSL108/2	OSSB14
H6	PIO6	OS024445	OSJ89
H7	PIO7	OS817MMAT	POPG47
H8	PIO8	OSL108/2	OSSB145126
H9	PIO9	OSSB14	OS5126
H10	PIO10	OS02606	OSJ89TM9
H11	PIO11	OS024445	OSJ89TM9
H12	PIO12	OS23-48	OSSB14
H13	PIO13	OS TOMASOV	
H14	ST1	P9911	
H15	ST2	DKC4608	
H16	PIO14	OS7215	OS5126

Inbred linije korištene kao ženski roditelj u hibridima pripadale su genetičkim skupinama Iodent (H1 do H8, H10, H11, H12, H13 i H16) te Iowa Stiff Stalk Synthetic (H9). Muške roditeljske komponente svih hibrida bile su miješanog porijekla Ohio 43 i Iowa Stiff Stalk Synthetic (**Troyer**, 1999., 2009.). Hibridi OS Tomasov i OS Kulak su komercijalni hibridi PIO.

Pokus je postavljen kao randomizirani blok dizajn s četiri bloka u četiri ponavljanja. Veličina pojedine parcele bila je 7m² (5 m * 0,7 m) u sklopu od približno 71 000 biljaka/ha odnosno 50 biljaka po parceli.

2.2. Agrotehnika i prinos zrna

Provedba agrotehnike za sve tri godine bila je podjednaka. Predkulture su bile pšenica (2017.) te ječam (2018. i 2019.). Nakon žetve predkultura obavljeno je prašenje strništa. Jesensko oranje provedeno je na dubinu 35 cm uz gnojdbu s 300 kg/ha NPK formulacije 7-20-30 i dodatak 100 kg/ha UREA-e. Jesenska agrotehnika provedena je svake godine prije 15.11. Zimska brazda zatvorena je u veljači ili ožujku ovisno o vremenskim uvjetima korištenjem teške drljače. Priprema za sjetvu bila je sjetvospremačem, a sjetva je bila ručnim sijačicama na polugu, po dva zrna u sjetvenu kućicu. Herbicidni tretman proveden je poslije sjetve, a prije nicanja korištenjem 1 L/ha DualGold 960 EC i 3 L/ha Koban T. U fazi 6 listova (V6) obavljeno je ručno prorjeđivanje sklopova na jednu biljku po sjetvenom mjestu. Međuredna kultivacija provedena je zajedno s prihranom korištenjem 250 kg/ha KAN. Korektivni međuredni tretmani provedeni su ručno po potrebi. Berba pokusnih parcela provedena je četverorednim pokusnim kombajnom Gleaner F2 (slika 1).



Slika 1. Pokusni kombajn Gleaner F2 u radu (foto: Vlatko Galić).

Prinos zrna parcele i vlaga određeni su u sučelju kombajna iz ukupnog uzorka. Prinos je izračunat na temelju 14 % vlage kao:

$$\text{Prinos zrna (t/ha)} = (\text{Prinos parcele (kg)} * \frac{\text{Vlaga uzorka}}{86} * \frac{10000\text{m}^2}{7\text{m}^2}) / 1000$$

Broj dana do berbe razlikovao se između godina. Godine 2017. raspon između sjetve i berbe bio je 165 dana, 2018. godine 168 dana, a 2019. godine 158 dana (**Tablica 2**).

Tablica 2. Datumi sjetve, berbe i metličanja, te broj dana od sjetve do cvatnje i od sjetve do berbe

Godina	Datum sjetve	Datum berbe	Metličanje 50%	Br. dana do cvatnje	Br. dana do berbe
2017.	27.4.	9.10.	13.7.	77	165
2018.	17.4.	2.10.	26.6.	70	168
2019.	26.4.	1.10.	12.7.	77	158

2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila *a*

Mjerenje fluorescencije klorofila *a* (fluorescencija) provedeno je u fazi metličanja u jutarnjim satima između 6:30 i 9:00 na 3 biljke po parceli u sredini reda (**Slika 2**). Mjerenje fluorescencije je provedeno na sredini lista na klipu, bez zahvaćanja centralne provodne žile nakon adaptacije na tamu u trajanju 25 do 30 minuta štipaljka s pjnom za brtvljenje i otvorom za ekspoziciju lista površine 12,56 mm² s kliznim perom (**Slika 3**).

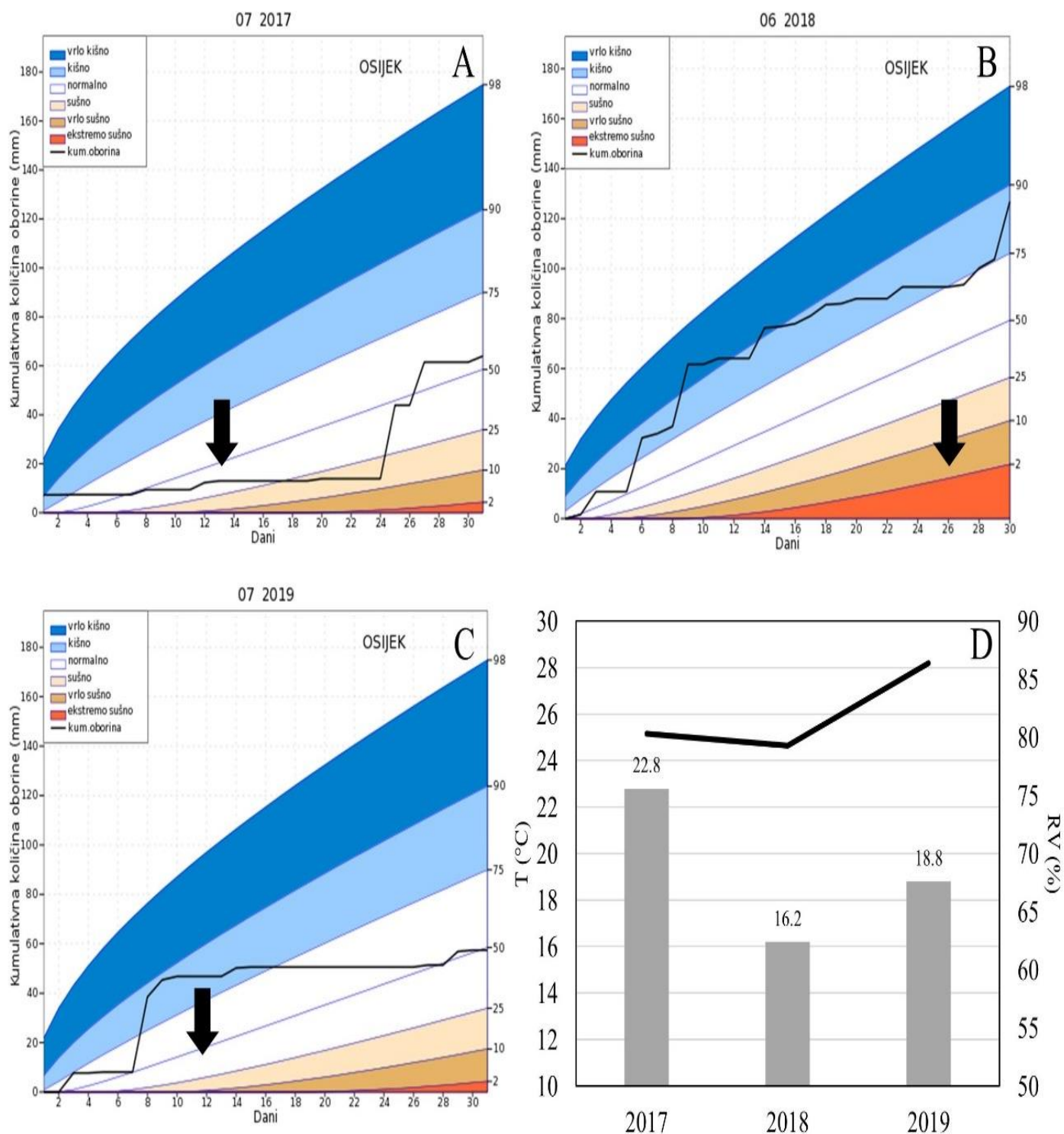


Slika 2. Štipaljka za adaptaciju na tamu na listu na klipu cvatuće biljke kukuruza (lijevo) i mjerenje fluorescencije klorofija a u polju ručnim fluorometrom (desno) (foto: Vlatko Galić).



Slika 3. Standardne štipaljke koje se koriste u postupku mjerenja flurescencije (foto: Vlatko Galić).

Atmosferski uvjeti u vremenu mjerenja prikazani su na **Slici 4.**



Slika 4. Kumulativne količine oborina u mjesecu kada je provedeno mjerenje fluorescencije klorofila *a* za 2017. (A), 2018. (B), 2019. (D) godinu te temperatura i relativna vlažnost zraka u vrijeme mjerenja. Na slikama A, B i C datumi mjerenja označeni su tamnom strelicom.

Za mjerenje je korišten ručni fluorometar Handy-PEA proizvođača Hansatech, Ujedinjeno Kraljevstvo (**Slika 5**).



Slika 5. Handy PEA uređaj (izvor: <http://www.hansatech-instruments.com/>).

Nakon adaptacije na tamu, na površinu lista je propušten puls jake svjetlosti (650 nm, 3,200 mmol m⁻² s⁻¹) koji pobuđuje fluorescenciju klorofila *a* koja tijekom prve sekunde nakon adaptacije pokazuje specifični uzorak rasta nazvan O-J-I-P prema fazama nulte fluorescencije (O), prvog platoa signala fluorescencije klorofila *a* (J), drugog platoa signala fluorescencije klorofila *a* (I), te maksimalne fluorescencije (P). Na osnovi teorije tokova energije, (**Strasser i sur.**, 1995.) ponudili su biofizička objašnjenja polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* na temelju čega je razvijen JIP-test (**Strasser i sur.**, 2000., 2004.). Podatci polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* sastoje se od 118 točaka izravno mjerenih signala (tranzijenata) tijekom jedne sekunde mjerenja, dok je 56 parametara JIP-testa izračunato na temelju modela tokova energije. Najosjetljiviji pokazatelj stanja fotosintetskog aparata biljaka je indeks fotosintetske učinkovitosti fotosustava II, PI_{ABS}. Za izračun ovog indeksa koriste se sljedeći parametri uvršteni u formulu:

$$PI_{ABS} = \frac{\gamma_{RC}}{1 - \gamma_{RC}} * \frac{\varphi_{Po}}{1 - \varphi_{Po}} * \frac{\psi_{Eo}}{1 - \psi_{Eo}}$$

1. γ_{RC} - vjerojatnost da molekula klorofila u fotosustavu II funkcionira kao reakcijsko središte

2. φ_{Po} - maksimalni kvantni prinos fotosustava II
3. ψ_{Eo} – vjerojatnost da eksitirani elektron bude prenesen dalje od plastokinona Q_A^-

Podatci dobiveni mjerenjima obrađeni su programom PEA Plus ver. 1.10. isporučenim s uređajem od strane proizvođača fluorimetra. Tijekom trogodišnjeg istraživanja s 16 hibrida u četiri ponavljanja generirano je ukupno 32.256 podatkovnih točaka JIP-testa, te 67.968 podatkovnih točaka tranzijenata polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*.

2.4. Izrada prediktivnih statističkih modela

Za izradu prediktivnih modela korištena je regresijska metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS, eng. Partial Least Squares). PLS metoda izabrana je jer za korištenje višestruke regresije metodom najmanjih kvadrata podatci ne smiju imati kompleksnu korelacijsku strukturu, tj. kolinearnost između prediktorskih varijabli nije dopuštena. S obzirom da su mjerenja fluorescencije sekvencijalna mjerenja, tranzijenti koji su vremenski manje udaljeni međusobno su u višoj korelaciji. Također, za izračun biofizičkih parametara koristi se mali broj mjerenih tranzijenata što u podatke uvodi kolinearnost.

PLS regresija temelji se na smanjivanju dimenzionalnosti podataka stvaranjem sintetskih varijabli minimalne međusobne korelacije iz podataka u kojima je prisutna kolinearnost (**Wold i sur.**, 1984.). Kolinearnost podrazumijeva postojanje visokih apsolutnih vrijednosti korelacije između različitih varijabli uključenih u radni set podataka. Stvaranje sintetskih varijabli obavlja se na temelju uklanjanja dijeljene varijance iz originalnih varijabli (penaliziranje) i to na način da svaka stvorena sintetska varijabla objašnjava što veći udio varijance u originalnim varijablama (*X*) i u zavisnoj varijabli koja je temelj modela (*y*). Za razliku od modela linearne regresije metodom najmanjih kvadrata

$$y = Xb + e$$

PLS algoritam podrazumijeva matrica reziduala modela *Z* proizlazi iz podatkovnih matrica *X* i *y* na način

$$Z = [X|y]$$

Na temelju ovog pravila formira se sekvenca rezidualnih matrica *Z_S* korištenjem algoritma:

Algoritam PLS:

1. Kreni s $Z_1 = [X|y], b_0 = 0$
2. Za $s = 1, 2, \dots$, dok $\|Z_s\|$ nije malen
 - 2.1. $u_s = X_s X_s' y_s \parallel X_s' y_s \parallel$.
 - 2.2. $c_s = \frac{Z_s' u_s}{u_s' u_s}, c_s = (a_s', p_s)'$.
 - 2.3. $Z_{s+1} = Z_s - u_s c_s'$.
 - 2.4. Riješi $A_s' b_s = r_s, r_s = (p_1, \dots, p_s)$ za b_s

Za izradu modela korištena je programska knjižnica pls (**Mevik i Wehrens, 2007.**). Izrađeno je po dva modela za predviđanje svakog svojstva i to: po jedan za predviđanje prinosa i vlage zrna koji je kao nezavisne varijable (prediktore) koristio 58 biofizičkih parametara, te po jedan za ista svojstva u kojem su kao prediktori korišteni nativni tranzijenti fluorescencije klorofila *a*, njih 118 (**Prilog 1**). Izrađeni modeli podvrgnuti su unakrsnoj statističkoj validaciji s 10 nasumičnih izvlačenja. Broj komponenata (sintetskih varijabli) za kalibrirane modele određen je na temelju apsolutno najmanje vrijednosti generalizirane standardne devijacije pogreške procjene (RMSEP, eng. Root Mean Square Error of Prediction).

2.5. Statistička obrada podataka i izrada statističkih modela

Svi podatci dobiveni u ovom istraživanju analizirani su u R programskom jeziku (**R Core Team, 2018.**). Za kvantitativno-genetičku analizu i procjenu komponenata varijance korištene su programske knjižnice *lme4* i (**Bates i sur., 2014.**) i *sommer* (**Covarrubias-Pazaran, 2016.**). Genetičke korelacije (r_G) procijenjene su prema **Bernardu** (2010.) kao:

$$r_G = \frac{Cov_{G(XY)}}{\sigma_{G(X)}\sigma_{G(Y)}}$$

Gdje je $Cov_{G(XY)}$ genetička kovarijanca između svojstava, $\sigma_{G(X)}$ genetička varijanca svojstva X, a $\sigma_{G(Y)}$ genetička varijanca svojstva Y. Prema istom autoru procijenjene su i efikasnost indirektna selekcije (EI) kao

$$EI = |r_G| h_X / h_Y$$

Gdje je $|r_G|$ apsolutna vrijednost genetičke korelacije, h_x kvadratni korijen heritabilnosti sekundarnog svojstva, a h_y kvadratni korijen heritabilnosti svojstva od interesa.

Heritabilnosti svojstava procijenjena je na temelju analize komponenata varijance prema **Hallaueru i sur.** (2010.) kao:

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \frac{\sigma_{GE}^2}{nE} + \frac{\sigma_e^2}{nEnR}}$$

Gdje σ_G^2 predstavlja komponentu genetičke varijance, σ_{GE}^2 interakciju genotip x okolina, σ_e^2 varijancu greške, a nE i nR broj okolina i broj ponavljanja.

Svojstva prinos i vlaga zrna mjerena na 16 hibrida kroz tri godine u četiri ponavljanja ($n = 192$) također su analizirani višefaktorijskom analizom varijance (ANOVA), te je proveden Fisherov test najmanjih značajnih razlika. Standardne greške srednjih vrijednosti izračunate su iz standardne devijacije i kvadratnog korijena broja uzoraka kao:

$$\text{Standardna greška} = \sigma / \sqrt{n}$$

Interakcija genotip-okolina, te utjecaj godina na reakcije pojedinih hibrida ispitan je korištenjem genotip-genotip x okolina (GGE) analize. Za potrebe GGE analize, podatci o svojstvima centrirani su prema srednjoj vrijednosti 0 na način:

$$y_i = X_i - \bar{X}$$

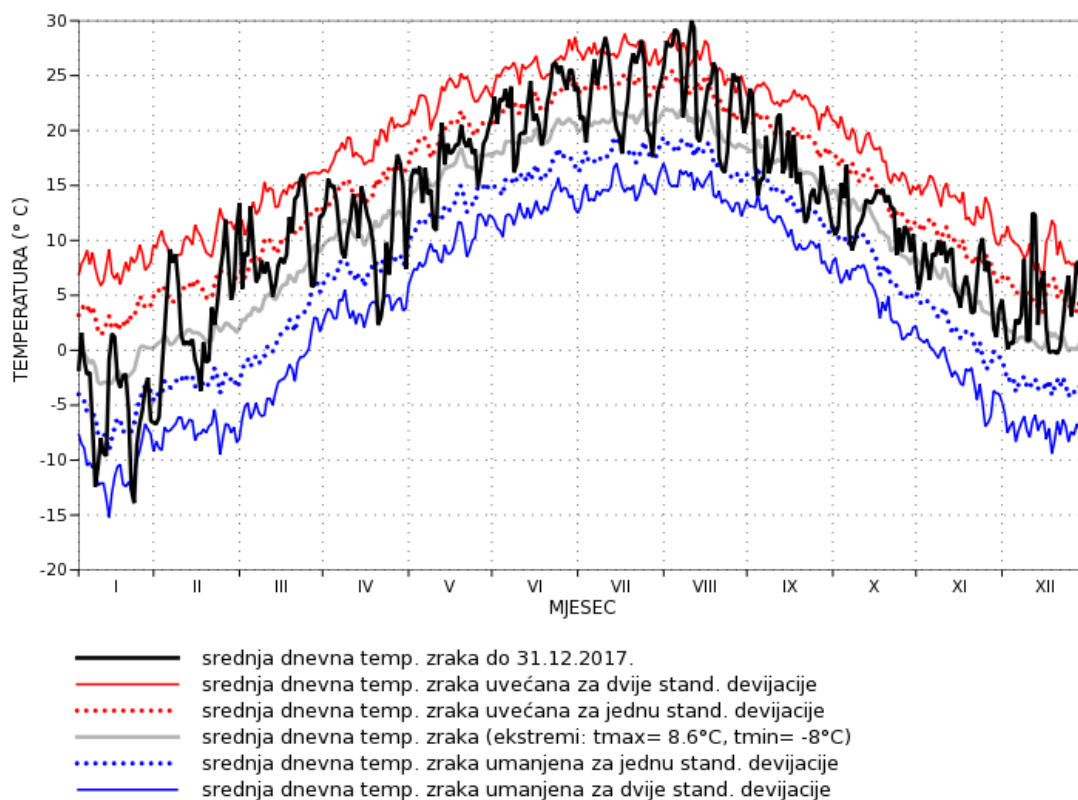
Te je na podacima provedena Z-transformacija dijeljenjem ostatka oduzimanja pojedinačnih vrijednosti od srednje vrijednosti i standardne devijacije:

$$y_i = (X_i - \bar{X}) / \sigma$$

Za izradu koordinatnog prikaza genotipova u odnosu na godine, korištena je metoda dekompozicije matrice na singularne vrijednosti (SVD, eng. *singular value decomposition*).

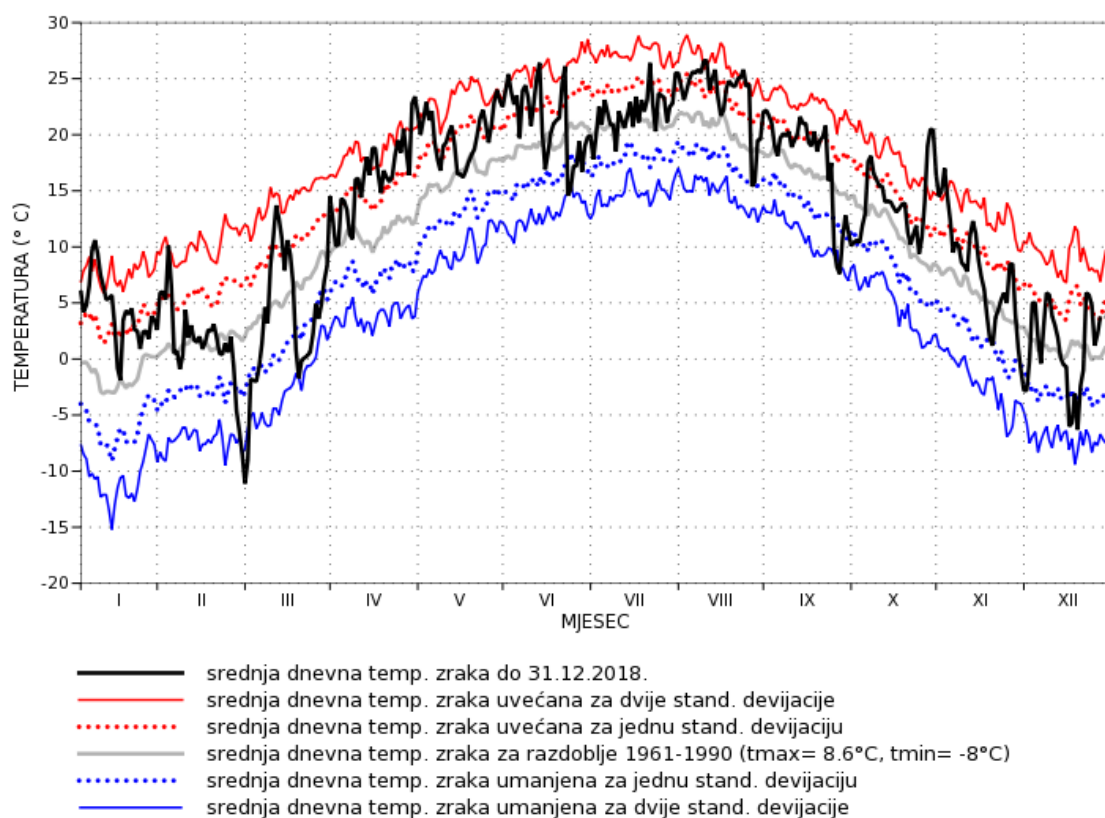
2.6. Agroklimatološki uvjeti

Vegetacijske sezone 2017. u lipnju, srpnju i kolovozu izmjerene su više temperature zraka u odnosu na razdoblje 1961. – 1990., te manji broj prekoračenja praga dvije standardne devijacije višegodišnjeg prosjeka (**Slika 6**).



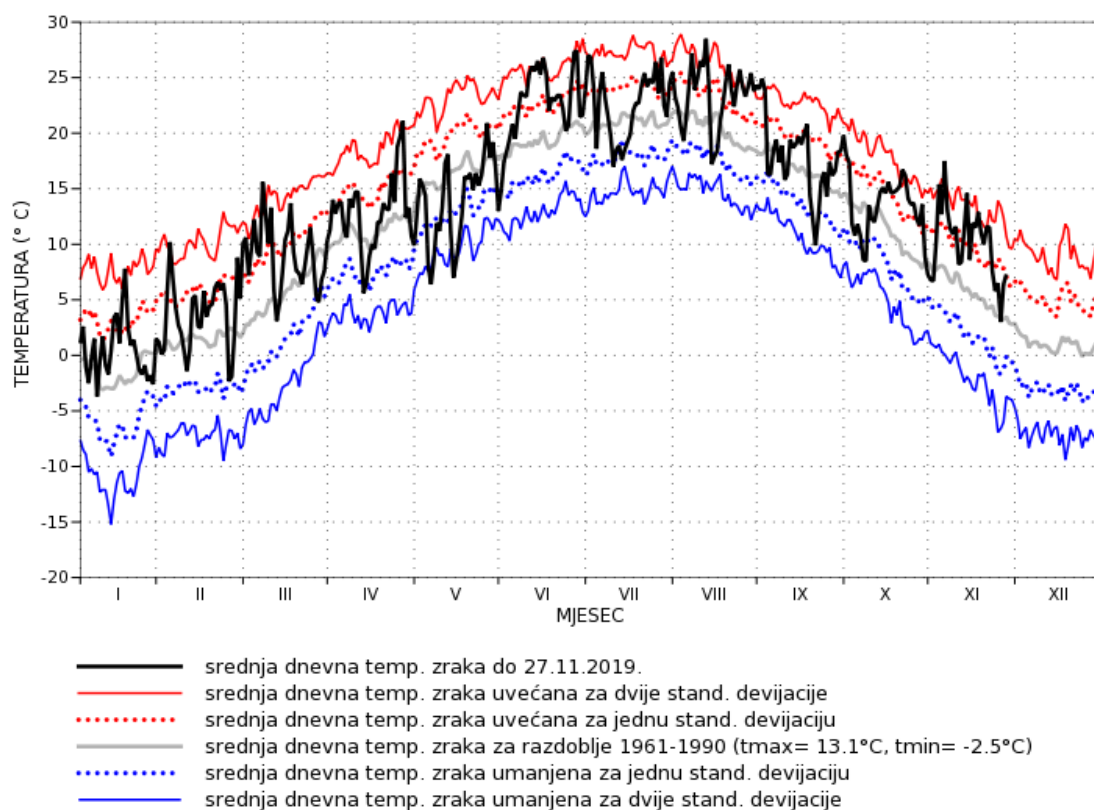
Slika 6. Srednje dnevne temperature za 2017. godinu u odnosu na višegodišnji prosjek (1961. – 1990.) na lokaciji Osijek (izvor: Državni hidrometeorološki zavod).

U vegetacijskoj sezoni 2018. godine uočen je drukčiji obrazac temperatura zraka. Iznadprosječno visoke temperature zraka izmjerene su nakon sjetve u travnju, te u svibnju i lipnju, dok su temperature krajem lipnja i početkom srpnja bile ispod višegodišnjeg prosjeka (**Slika 7**).



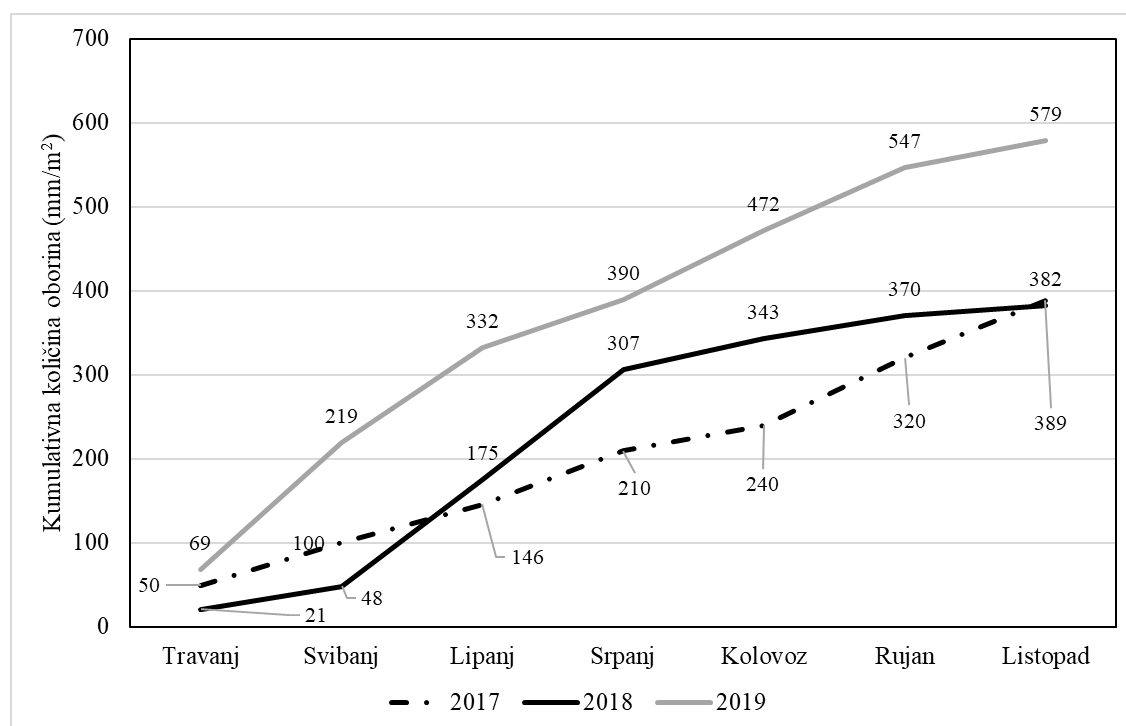
Slika 7. Srednje dnevne temperature za 2018. godinu u odnosu na višegodišnji prosjek (1961. – 1990.) na lokaciji Osijek (izvor: Državni hidrometeorološki zavod).

U vegetacijskoj sezoni 2019. izmjerene su temperature niže od višegodišnjeg prosjeka u svibnju, te više od višegodišnjeg prosjeka u lipnju (**Slika 8**). U mjesecu srpnju, nakon kraćeg perioda s temperaturama nižim od višegodišnjeg prosjeka, izmjerene su temperature više od višegodišnjeg prosjeka.



Slika 8. Srednje dnevne temperature za 2019. godinu u odnosu na višegodišnji prosjek (1961. – 1990.) na lokaciji Osijek (izvor: Državni hidrometeorološki zavod).

Ukupne količine oborina tijekom vegetacijske sezone bile su više u 2019. godini u odnosu na 2017. i 2018. Akumulacija oborina u 2017. i 2019. godini bila je pravilnija u usporedbi s 2018. u kojoj su travanj i svibanj bili sušniji, a lipanj i srpanj kišoviti (**Slika 9**). Tijekom sedam mjeseci vegetacijske sezone akumulirano je 389 mm oborina 2017., 389 mm 2018. te 579 mm. 2019. godine.

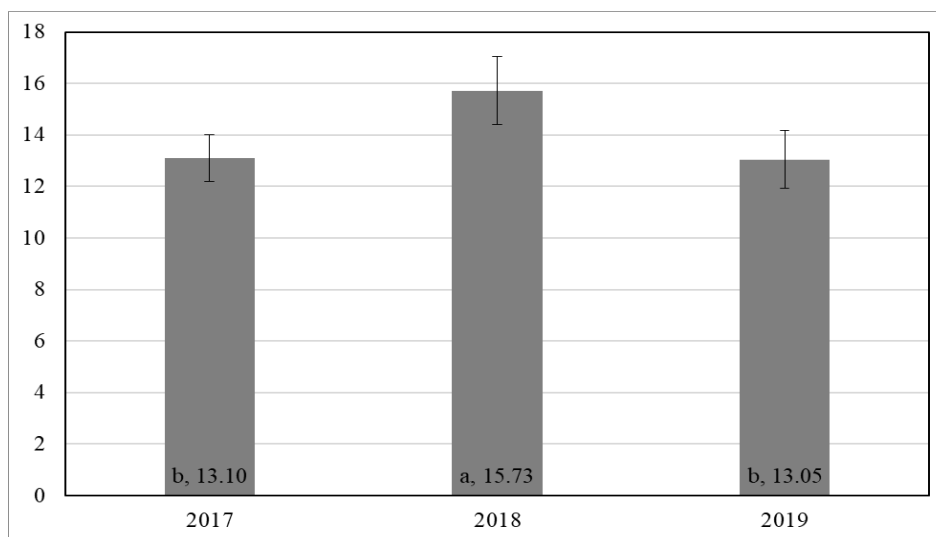


Slika 9. Kumulativna količina oborina od sjetve do berbe za 2017., 2018. i 2019. godinu.

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. Analiza varijance prinosa zrna

U pokusima je ostvaren prosječni prinos zrna za svih 16 ispitivanih hibrida 13,10 t/ha 2017. godine, 15,73 t/ha 2018. godine te 13,05 t/ha 2019. godine (**Grafikon 1**).



Grafikon 1. Srednje vrijednosti i standardne greške prinosa zrna svih 16 ispitivanih hibrida za 2017., 2018. i 2019. godinu. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Analiza varijance pokazala je značajan učinak genotipa, godine i ponavljanja pri $p \leq 0,001$, dok učinci bloka i interakcije genotip - godina nisu bili značajni (**Tablica 3**). Visoko značajan učinak ponavljanja upućuje na razlike u sklopu (broj biljaka) uslijed suše i slične pojave uobičajene kod pokusa postavljenih u poljskim uvjetima.

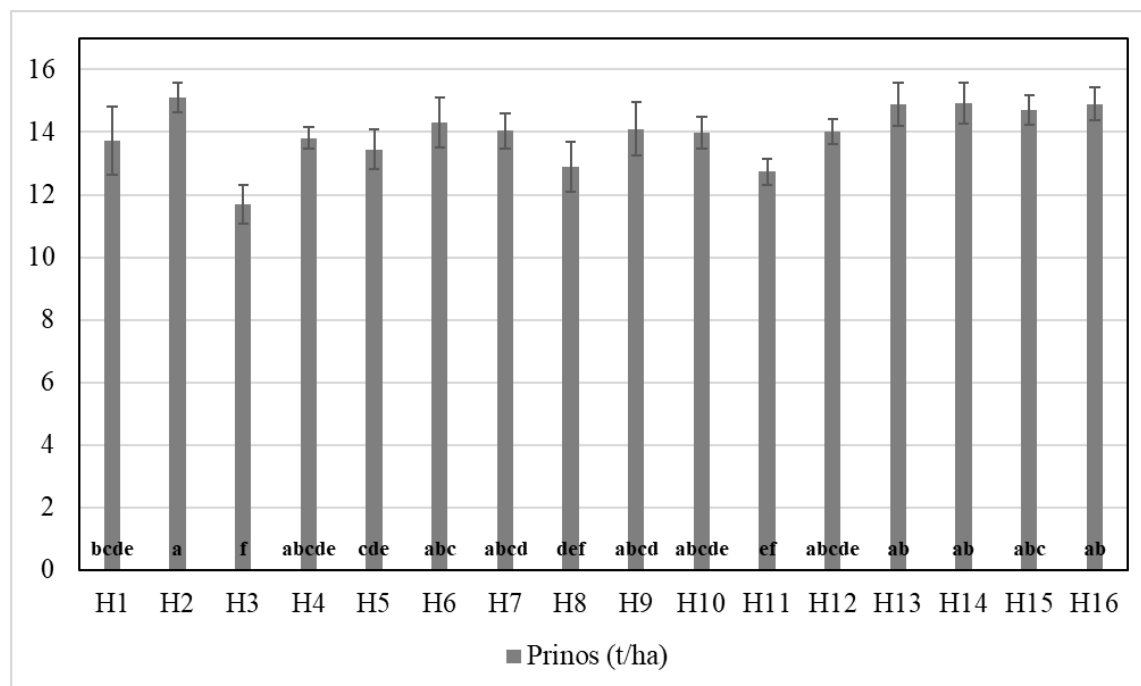
Tablica 3. Analiza varijance (ANOVA) prinosa zrna

Izvori variranja	Df	SS	MS	F	p	
Genotip	15	153.6	10.2	4.0	<0.001	***
Godina	2	296.3	148.1	57.2	<0.001	***
Ponavljjanje	9	94.2	10.5	4.0	<0.001	***
Blok	9	39.8	4.4	1.7	0.094	n.s.
Genotip:godina	30	116.2	3.9	1.5	0.065	n.s.
Greška	126	326.2	2.6			

Znakovi *, ** i *** predstavljaju značajnosti pri $p = 0,05$, $p = 0,01$ i $p = 0,001$. Oznaka n.s. predstavlja izostanak značajnog učinka na svojstvo.

Na temelju značajnih učinaka godine na prinos zrna u analizi varijance, proveden je test najmanjih značajnih razlika. Utvrđene su statistički značajne razlike između prinosa zrna 2018. i preostale dvije ispitivane godine, dok između 2017. i 2019. nisu utvrđene statistički značajne razlike (**Grafikon 1**).

Između ispitivanih hibrida utvrđene su statistički značajne razlike u prinosu zrna prosječno za sve tri godine istraživanja. Značajno najviši prinos zrna utvrđen je kod hibrida H2, H4, H6, H7, H9, H10, H12, H13, H14, H15 i H16, dok su kod hibrida H1, H3, H8, te H11 utvrđeni statistički značajno niži prinosi zrna koji su se i međusobno značajno razlikovali (**Grafikon 2**). Prosječni prinos zrna skupine hibrida sa značajno višim prinosom bio je 14,43 t/ha. Komercijalni strani standardi (H14 i H15) nalazili su se u skupini hibrida s najvišim prinosom zrna i između njih nisu utvrđene značajne razlike.



Grafikon 2. Srednje vrijednosti i standardne greške prinosa zrna 16 ispitivanih hibrida kroz sve tri godine istraživanja. Različita prva slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

3.2 Analiza varijance vlage zrna u berbi

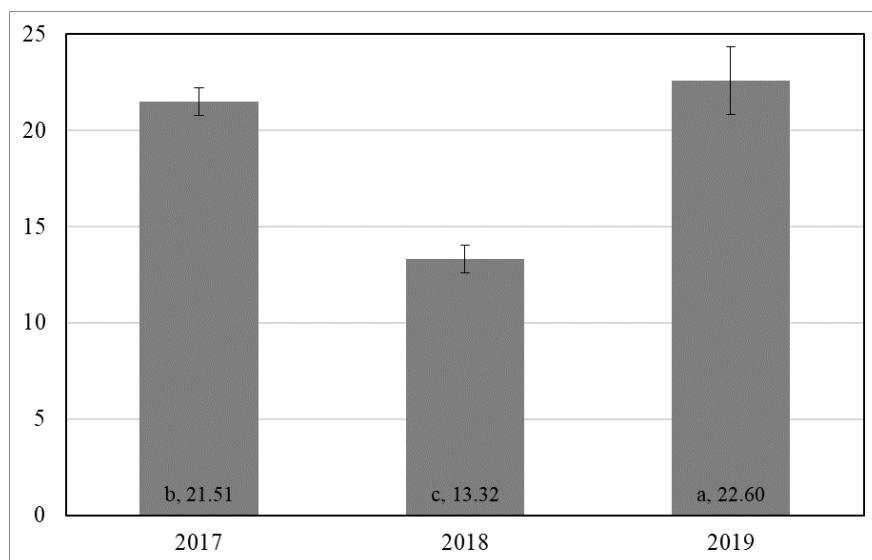
U analizi varijance utvrđeni su značajni učinci genotipa, godine, bloka, te genotip – godina interakcije na vlagu zrna u berbi.

Tablica 4. Analiza varijance (ANOVA) vlage zrna u berbi

Izvori variranja	Df	SS	MS	F	p	
Genotip	15	425.3	28.4	35.6	<0.001	***
Godina	2	3236.4	1618.2	2029.5	<0.001	***
Ponavljanje	9	11.2	1.3	1.6	0.132	n.s.
Blok	9	19.9	2.2	2.8	0.005	**
Genotip:godina	30	276.9	9.2	11.6	<0.001	***
Greška	126	100.5	0.8			

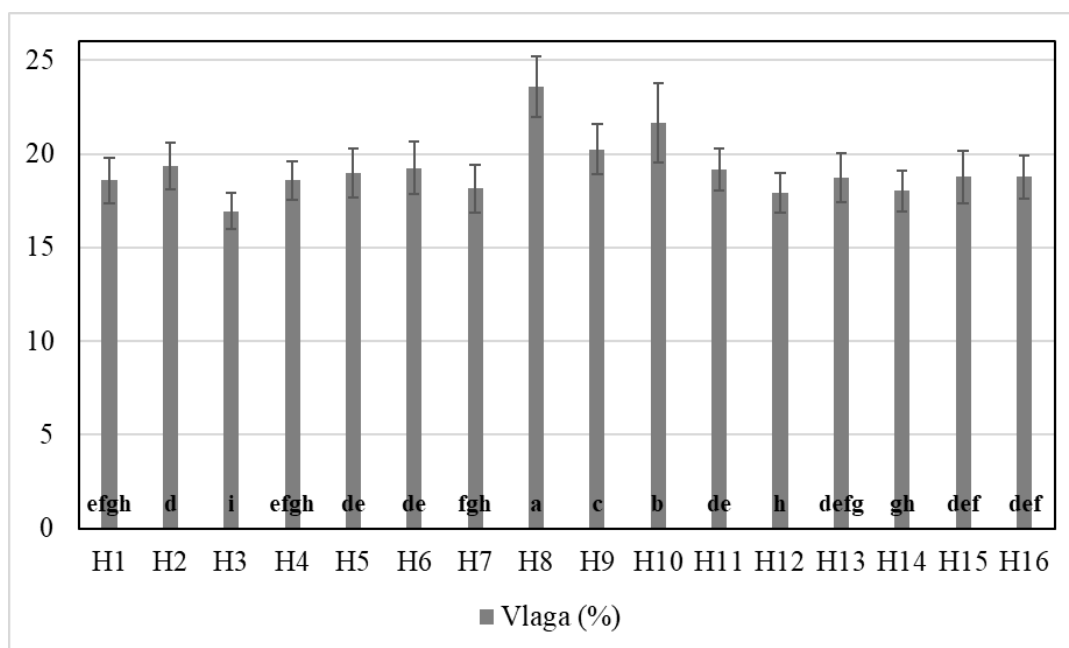
Znakovi *, ** i *** predstavljaju značajnosti pri $p = 0,05$, $p = 0,01$ i $p = 0,001$. Oznaka n.s. predstavlja izostanak značajnog učinka na svojstvo.

Najviša prosječna vlaga zrna za svih 16 ispitivanih hibrida ostvarena je 2019. godine i iznosila je 22,60%. Prosječna vlaga zrna u berbi 2017. bila je značajno niža u odnosu na vlagu 2019. godine i iznosila je 21,51%, dok je značajno najniža vlaga zrna od 13,32% ostvarena 2018. godine (**Grafikon 3**).



Grafikon 3. Srednje vrijednosti i standardne greške vlage zrna u berbi svih 16 ispitivanih hibrida za 2017., 2018. i 2019. godinu. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Između ispitivanih hibrida utvrđene su statistički značajne razlike vlage zrna u berbi. Najviša vlaga zrna u berbi uočena je kod hibrida H8 i iznosila je 23,60 %. Najnižu vlagu zrna u berbi ostvario je hibrid H3 i ona je iznosila 16,93 % (**Grafikon 4**). Najniža vlaga kod hibrida H3 također je praćena najnižim prinosom zrna. Strani komercijalni standardi (H14 i H15) značajno su se razlikovali u vlazi zrna u berbi. Značajno viša vlaga izmjerena je kod hibrida H15 (18,75 %) u odnosu na hibrid H14 (18,01 %)



Grafikon 4. Srednje vrijednosti i standardne greške vlage zrna u berbi 16 ispitivanih hibrida kroz sve tri godine istraživanja. Različita prva slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

3.3. Analiza varijance kvantnog prinosa primarnih fotokemijskih reakcija (Fv/Fm)

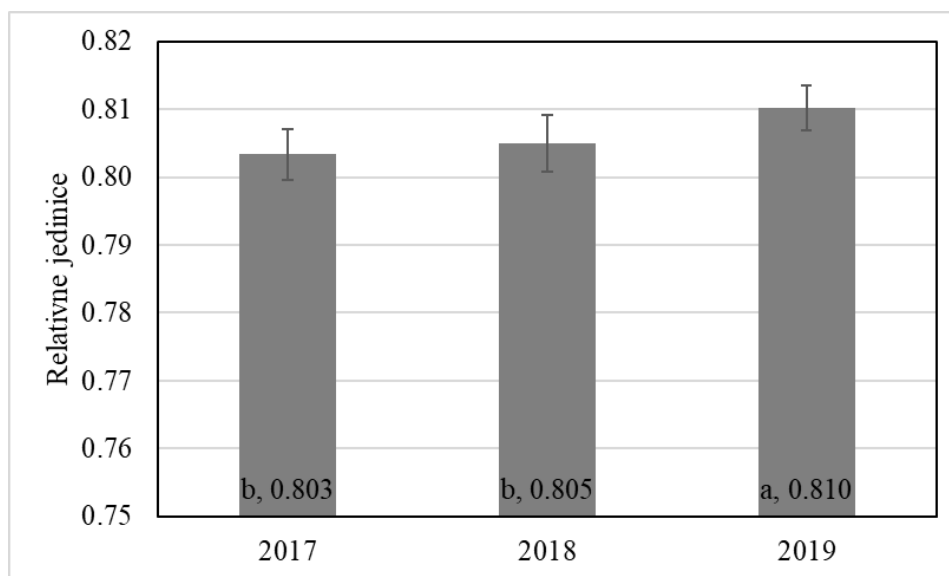
Analiza varijance Fv/Fm pokazala je značajne učinke genotipa, godine, ponavljanja i bloka na svojstvo, dok učinak interakcije genotip-godina nije bio značajan (**Tablica 5**).

Tablica 5. Analiza varijance (ANOVA) Fv/Fm u cvatnji

Izvori variranja	Df	SS	MS	F	p	
Genotip	15	0.00144	0.00010	3.3	<0.001	***
Godina	2	0.00166	0.00083	28.3	<0.001	***
Ponavljanje	9	0.00130	0.00014	4.9	<0.001	***
Blok	9	0.00053	0.00006	2.0	0.046	*
Genotip:godina	30	0.00094	0.00003	1.1	0.383	n.s.
Greška	126	0.00369	0.00003			

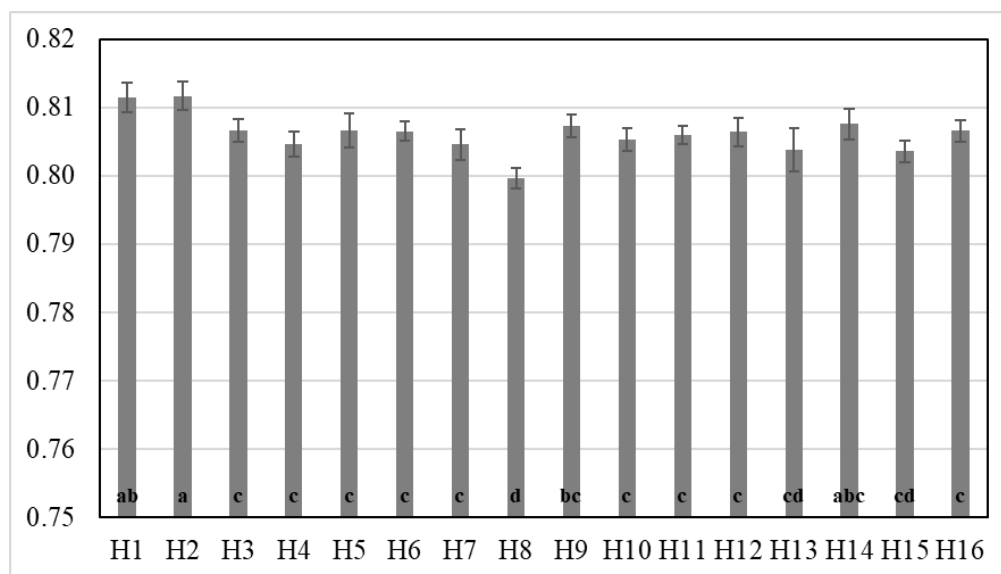
Znakovi *, ** i *** predstavljaju značajnosti pri $p = 0,05$, $p = 0,01$ i $p = 0,001$. Oznaka n.s. predstavlja izostanak značajnog učinka na svojstvo.

Značajno najviša vrijednost Fv/Fm od 0.810 ostvarena je 2019. godine (**Grafikon 5**), dok između 2017. (0.803) i 2018. (0.805) nisu utvrđene značajne razlike.



Grafikon 5. Srednje vrijednosti i standardne greške Fv/Fm u cvatnji svih 16 ispitivanih hibrida za 2017., 2018. i 2019. godinu. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Između ispitivanih hibrida, prosječno za sve godine istraživanja, utvrđene su statistički značajne razlike u Fv/Fm (**Grafikon 6**). Značajno najviše vrijednosti Fv/Fm ostvarili su hibridi H1, H2, H9 i H14 (0,811, 0,811, 0,807 i 0,807), dok je značajno najniža vrijednost zabilježena kod hibrida H8 (0,799). Između Fv/Fm dva strana standarda (H14 i H15) utvrđene su značajne razlike (0,807 i 0,803).



Grafikon 6. Srednje vrijednosti i standardne greške Fv/Fm u cvatnji 16 ispitivanih hibrida kroz sve tri godine istraživanja. Različita prva slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

3.4. Analiza varijance fotosintetičke učinkovitosti fotosustava II (PI_{ABS})

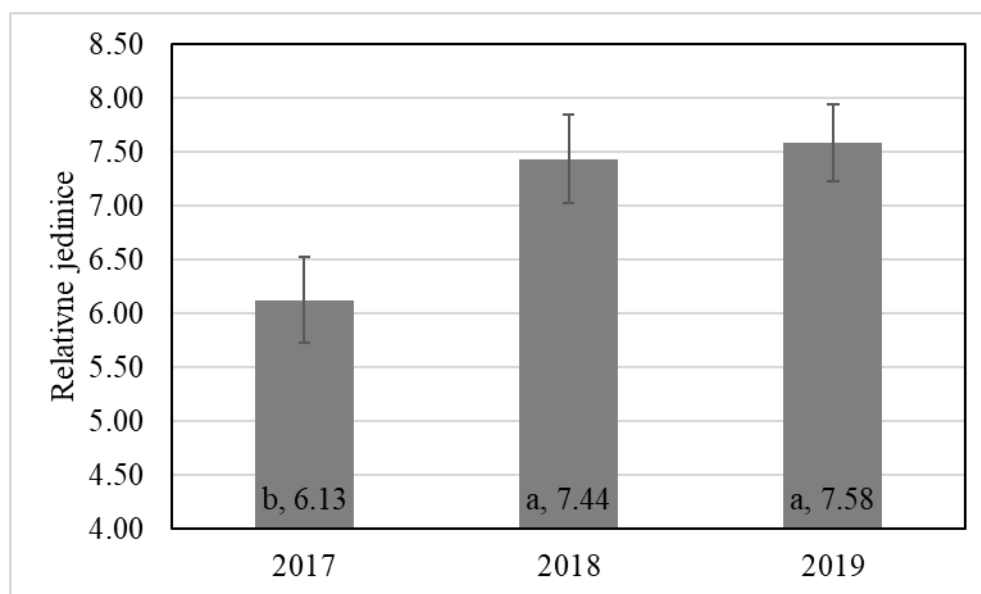
Analiza varijance PI_{ABS} pokazala je značajne učinke genotipa, godine, ponavljanja, te bloka, dok učinak genotip-godina interakcije nije bio značajan (**Tablica 6**).

Tablica 6. Analiza varijance (ANOVA) PI_{ABS} u cvatnji

Izvori variranja	Df	SS	MS	F	P	
Genotip	15	26.4	1.8	6.4	<0.001	***
Godina	2	82.5	41.3	150.9	<0.001	***
Ponavljjanje	9	9.8	1.1	4.0	<0.001	***
Blok	9	5.4	0.6	2.2	0.026	*
Genotip:godina	30	8.1	0.3	1.0	0.493	n.s.
Greška	126	34.5	0.3			

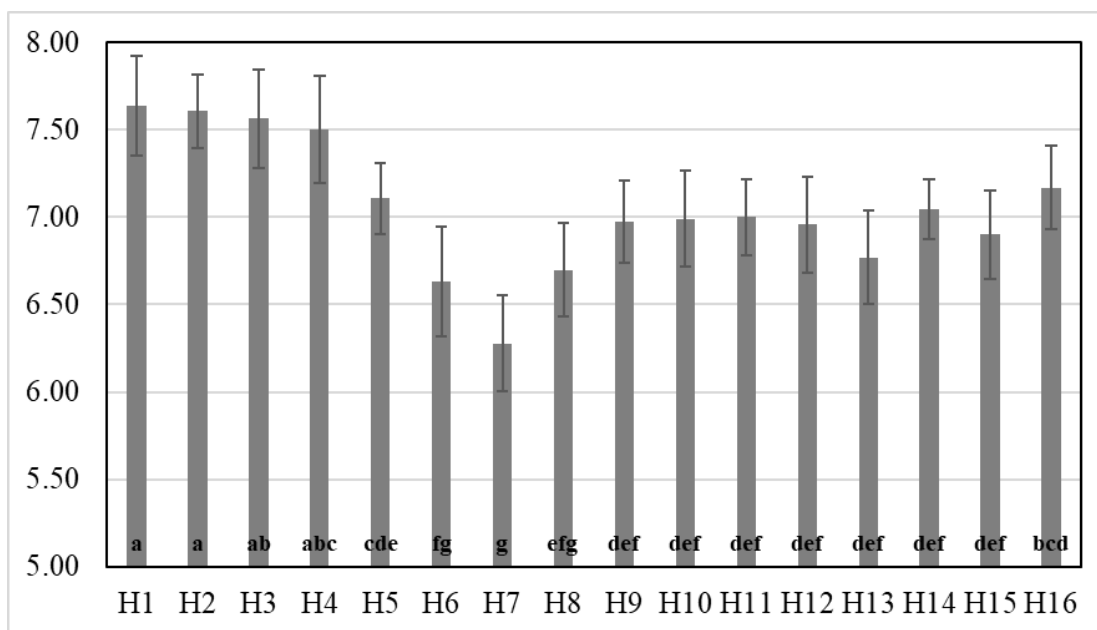
Znakovi *, ** i *** predstavljaju značajnosti pri $P = 0,05$, $P = 0,01$ i $P = 0,001$. Oznaka n.s. predstavlja izostanak značajnog učinka na svojstvo.

Značajno najniža vrijednost indeksa PI_{ABS} (6,13) ostvarena je 2017. godine u odnosu na preostale dvije godine istraživanja (**Grafikon 7**). Vrijednosti indeksa iz 2017. (7,44) i 2018. (7,58) međusobno se nisu značajno razlikovale.



Grafikon 7. Srednje vrijednosti i standardne greške PI_{ABS} u cvatnji svih 16 ispitivanih hibrida za 2017., 2018. i 2019. godinu. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

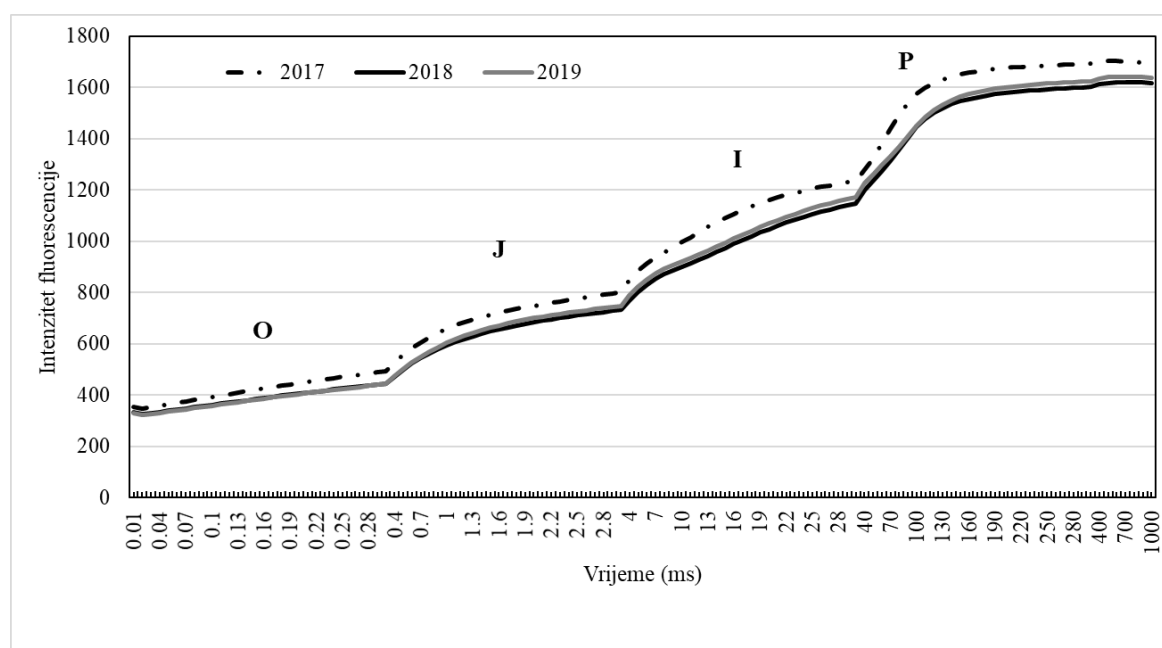
Između ispitivanih hibrida, prosječno za sve godine istraživanja, utvrđene su statistički značajne razlike u PI_{ABS} . Značajno najviše vrijednosti indeksa ostvarili su hibridi H1, H2, H3 i H4 (prosjek 7,57), dok je značajno najniža vrijednost zabilježena kod hibrida H7 (6,27) (**Grafikon 8**). Između indeksa učinkovitosti dva strana standarda (H14 i H15) nisu utvrđene značajne razlike.



Grafikon 8. Srednje vrijednosti i standardne greške PI_{ABS} u cvatnji 16 ispitivanih hibrida kroz sve tri godine istraživanja. Različita prva slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

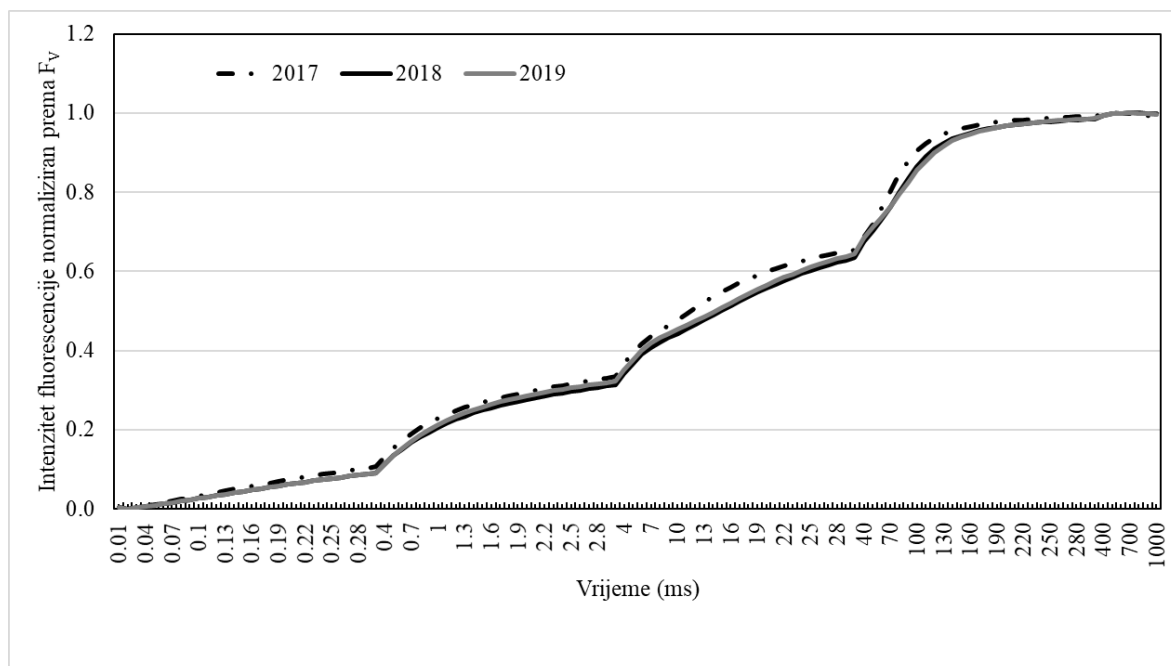
3.5. OJIP tranzijenti kroz tri godine istraživanja

U nativnim podacima tranzijenata indukcije fluorescencije fotosustava II prosječno za sve hibride opažen je relativno viši intenzitet fluorescencije u 2017. godini u odnosu na preostale dvije godine. Povišeni intenzitet rezultirao je i povišenom vrijednosti maksimalne fluorescencije (F_M), no ne i nulte fluorescencije (F_0). Na krivulji indukcije fluorescencije klorofila *a* jasno su se izdvojili prijelazni platoi signala nulte fluorescencije (O), prvog platoa signala fluorescencije klorofila *a* (J), drugog platoa signala fluorescencije klorofila *a* (I), te maksimalne fluorescencije (P) (**Grafikon 9**).



Grafikon 9 . Nativni tranzijenti fluorescencije klorofila *a* u cvatnji kroz tri godine istraživanja prosječno za sve ispitivane hibride.

Kada su tranzijenti fluorescencije klorofila *a* normalizirani s ukupnom varijabilnom fluorescencijom ($F_M - F_0$), uočeno je ujednačavanje krivulja između tri godine ispitivanja. Na normaliziranim krivuljama tranzijenata uočene su razlike u I koraku i u prijelazu iz I u P korak između 2017. godine i preostale dvije godine istraživanja (**Grafikon 10**).



Grafikon 10.. Normalizirani tranzijenti fluorescencije klorofila *a* u cvatnji kroz tri godine istraživanja prosječno za sve ispitivane hibride.

3.6. Komponente varijance procijenjene mješovitim modelom i korelacije za prinos zrna, vlagu zrna, Fv/Fm te PI_{ABS}

Analiza varijance mješovitim modelom pokazala je komponente varijance veće od nule za sve ispitivane faktore (**Tablica 7**). Varijanca objašnjena genotipom za prinos zrna bila je viša u odnosu na varijancu objašnjenu genotip-okolina interakcijom, a niža u odnosu na varijancu greške. Ostvarena je umjereno visoka heritabilnost prinosa zrna (0,64) s niskim iznosom greške procjene (0,17). Komponenta varijance objašnjene genotipom za vlagu zrna bila je viša u odnosu na varijancu greške, a niža u odnosu na varijancu objašnjenu genotip-okolina interakcijom. Ostvarena je umjereno visoka heritabilnost svojstva (0,62) s niskim iznosom greške procjene (0,17). Komponenta varijance objašnjena genotipom za svojstvo Fv/Fm bila je niža u odnosu na komponentu varijance objašnjene genotip-okolina interakcijom i varijancu greške. Za svojstvo Fv/Fm ostvarena je visoka procjena heritabilnosti (0,70) s niskom vrijednosti greške procjene (0,13). Varijanca objašnjena genotipom za PI_{ABS} bila je viša u odnosu na varijancu objašnjenu interakcijom genotip-okolina, i niža za 55,5 % u odnosu na varijancu greške što je rezultiralo visokom procjenom heritabilnosti svojstva (0,84) s izrazito niskom greškom procjene (0,07).

Tablica 7. Komponente varijance za svojstva prinos zrna, vlaga, Fv/Fm i PI_{ABS}

Komponente varijance	Prinos	Vlaga	Fv/Fm	PI _{ABS}
σ^2_G	0.553	1.296	5.88E-06	0.120
σ^2_E	2.124	25.335	1.02E-05	0.622
$\sigma^2_{G \times E}$	0.307	2.209	7.17E-05	0.003
σ^2_e	2.593	0.795	2.97E-05	0.272
H^2	0.64 ± 0.17	0.62 ± 0.17	0.70 ± 0.13	0.84 ± 0.07

* σ^2_G predstavlja varijancu objašnjenu genotipom, σ^2_E varijancu objašnjenu okolinom, $\sigma^2_{G \times E}$ varijancu objašnjenu interakcijom genotip-okolina, σ^2_e varijancu greške modela, a H^2 heritabilnost

Analiza Pearsonovih produkt-moment korelacija (**Tablica 8, iznad dijagonale**) pokazala je značajno različitu od nule ($P < 0,001$) umjerenu do slabu negativnu korelaciju (-0,49) između prinosa i vlage zrna u berbi. Korelacija između prinosa zrna i PI_{ABS} bila je pozitivna slaba do vrlo slaba (0,16), značajno različita od nule pri $P < 0,05$.

Između indeksa PI_{ABS} i vlage zrna u berbi opažena je slaba do vrlo slaba negativna korelacija (-0,20) značajno različita od nule pri $P < 0,01$. Značajno različita od nule pri $P < 0,001$ korelacija za svojstvo Fv/Fm opažena je samo s PI_{ABS} (0,40). Genetičke korelacije između svih svojstava bile su uglavnom vrlo slabe negativne (**Tablica 8, ispod dijagonale**). Umjerena negativna genetička korelacija opažena je između svojstava Fv/Fm i vlage zrna u berbi (-0,61) s pogreškom procijene nižom od polovice iznosa korelacije (0,20). Jaka genetička korelacija opažena je između svojstava Fv/Fm i PI_{ABS} (0,76) s pogreškom procijene nižom od polovice iznosa korelacije (0,20). Kod ostalih izračunatih genetičkih korelacija, greška procjene bila je niža od procjenjenog iznosa korelacije samo između PI_{ABS} i vlage zrna u berbi (0,19), uz vrlo niski iznos korelacije (-0,24).

Tablica 8. Koeficijenti Pearsonovih produkt-moment korelacija (iznad dijagonale) i genetičkih korelacija izračunatih iz matrice genetičke varijance-kovarijance dobivene mješovitim modelom, te standardne greške procjena.

r	Prinos	Vlaga	Fv/Fm	PI_{ABS}
Prinos	–	-0.49***	0.06	0.16*
Vlaga	-0.10 ± 0.42	–	0.08	-0.20**
Fv/Fm	0.35 ± 0.37	-0.61 ± 0.30	–	0.40***
PI_{ABS}	-0.24 ± 0.35	-0.24 ± 0.19	0.76 ± 0.20	–

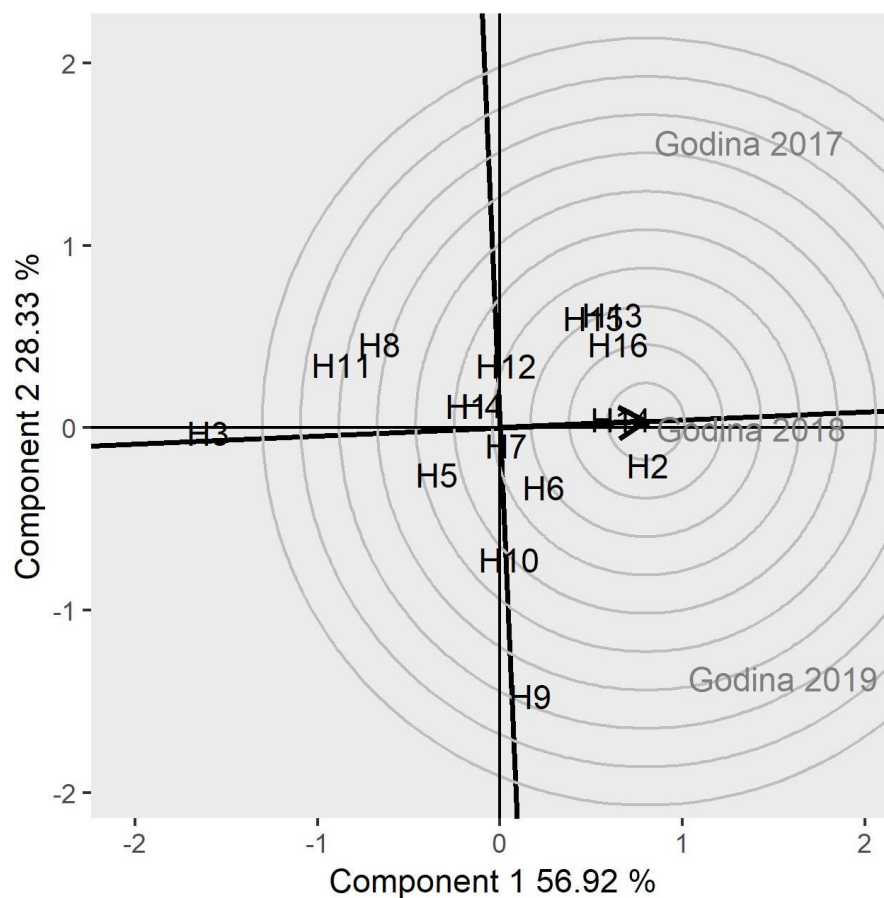
*Znakovi *, ** i *** predstavljaju značajnu razliku od nule pri $P = 0,05$, $P = 0,01$ i $P = 0,001$

3.7. Analiza genotipskih i genotip x okolina efekata

S ciljem daljnje analize rezultata pojedinih genotipova i utjecaja genotip-okolina interakcije na njihove rezultate, provedena je GGE analiza.

U GGE analizi prinosa zrna, 58 % ukupne sume kvadrata za svojstvo objašnjeno je prvom glavnom sastavnicom. Druga glavna sastavnica objasnila je 26 % ukupne sume kvadrata. U prve dvije sastavnice objašnjeno je 85,25 % ukupne sume kvadrata. Vektori sve tri godine istraživanja bili su usmjereni prema pozitivnoj strani prve glavne sastavnice. Vektor za 2018. godinu nalazio se blizu ishodišta druge glavne sastavnice koja objašnjava Genotip-okolina interakciju, dok su vektori za 2017. i 2019. godinu bili usmjereni prema pozitivnom i negativnom kraju druge glavne sastavnice.

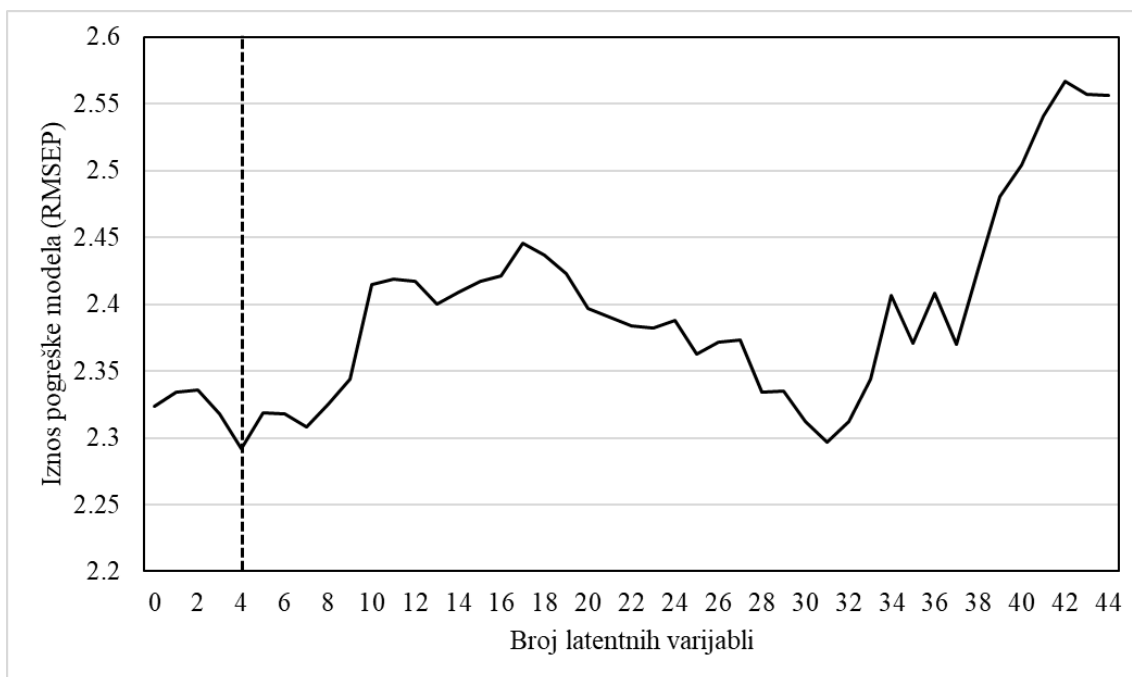
Najviše vrijednosti stabilnosti u kombinaciji s visokim prinosom ostvarili su hibridi H2 i strani standard H14. Najmanja relativna stabilnost u kombinaciji s prosječnim prinosom zabilježena je kod hibrida H9, dok je H3 ostvario nizak prinos uz visoku relativnu stabilnost. Vanjski obruč genotipskih i genotip-okolina interakcijskih efekata činili su genotipovi koji su ostvarili najvišu apsolutnu vrijednost u pojedinim segmentima analize. Hibrid H2 ostvario je najvišu vrijednost na prvoj glavnoj sastavnici. Hibrid H13 ostvario je najvišu pozitivnu vrijednost u prvoj glavnoj sastavnici u pozitivnom kvadrantu obje glavne sastavnice. Hibrid H15 ostvario je najvišu vrijednost u drugoj glavnoj sastavnici u kvadrantu negativnom u prvoj, a pozitivnom u drugoj glavnoj sastavnici. U istom kvadrantu, najvišu apsolutnu vrijednost u prvoj glavnoj sastavnici ostvario je hibrid H11. U kvadrantu negativnom u obje glavne sastavnice, rubnu vrijednost ostvario je hibrid H3. Rubnu vrijednost u kvadrantu pozitivnom u prvoj i negativnom u drugoj glavnoj sastavnici ostvario je hibrid H9 (Slika 10).



Slika 10. Prikaz biplot učinaka genotipa i interakcije genotip-okolina (GGE) za prinos zrna te „idealni hibrid“ (strelica unutar kruga) za ispitivane okoline.

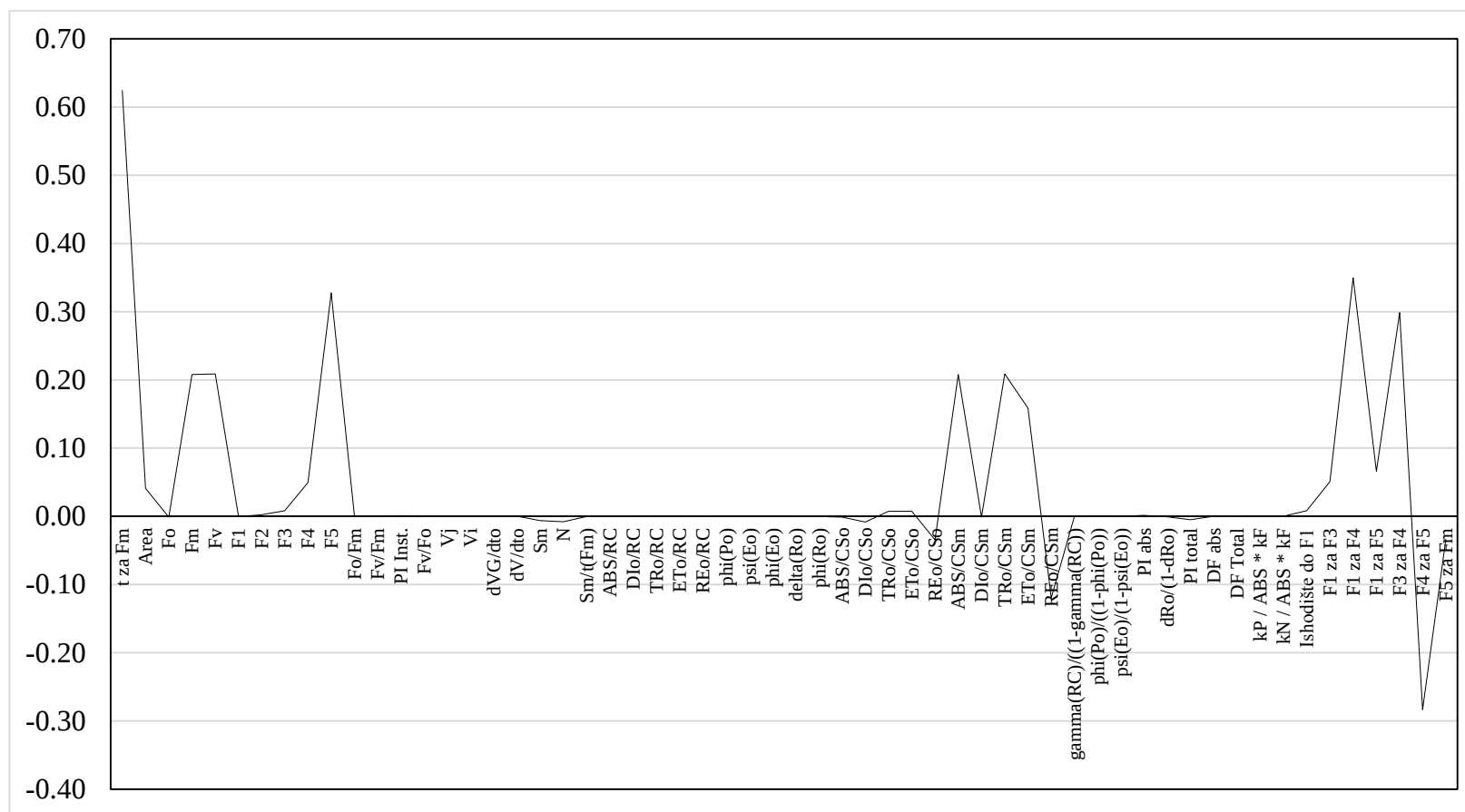
3.8. Statistički modeli za predviđanje prinosa zrna

Korištenjem 58 biofizičkih parametara za predviđanje prinosa zrna, utvrđen je porast vrijednosti RMSEP s porastom broja latentnih varijabli. Ukupno je procijenjeno 44 latentne varijable, a najniža je vrijednost RMSEP (2,292) ostvarena sa 4 latentne varijable (**Grafikon 11**), te je stoga model s 4 latentne varijable smatran kalibriranim modelom i korišten za predviđanje vrijednosti prinosa zrna.



Grafikon 11. Iznos greške modela (RMSEP) s biofizičkim parametrima fluorescencije klorofila a kao prediktorima povećanjem broja latentnih varijabli.

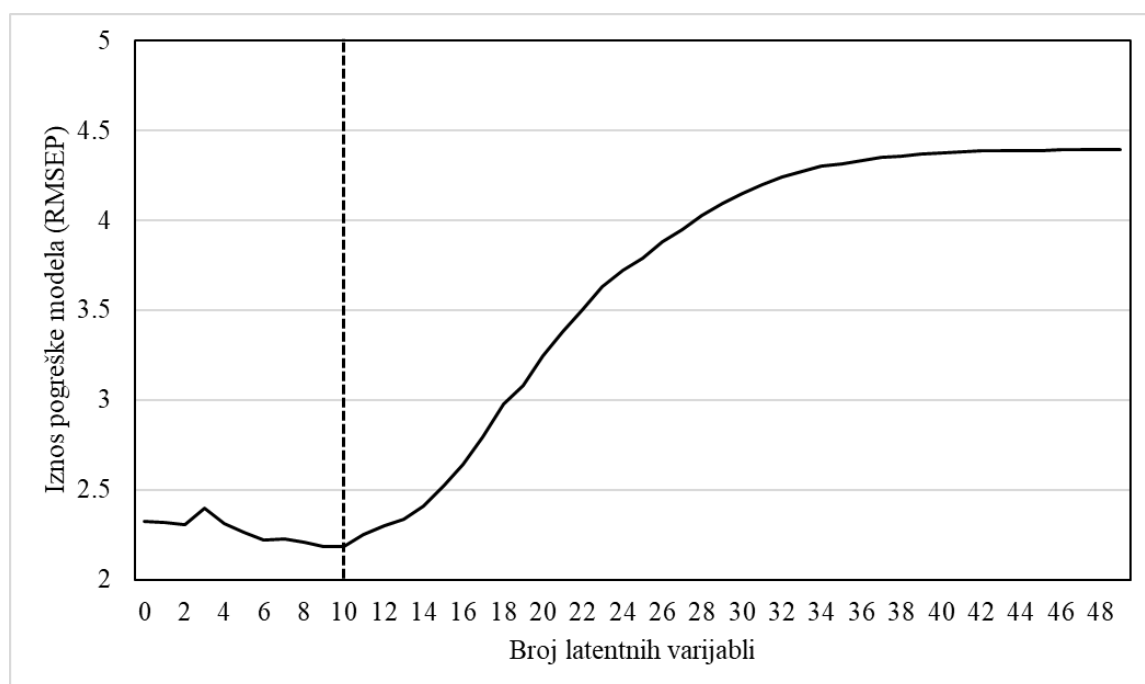
Vrijednosti pondera pojedinih biofizičkih parametara u kalibriranom modelu prikazane su na **Grafikonu 12**.



Grafikon 12. Vrijednosti pondera pojedinih biofizičkih parametara fluorescencije klorofila a u PLS modelu s četiri latentne varijable za predviđanje prinosa zrna.

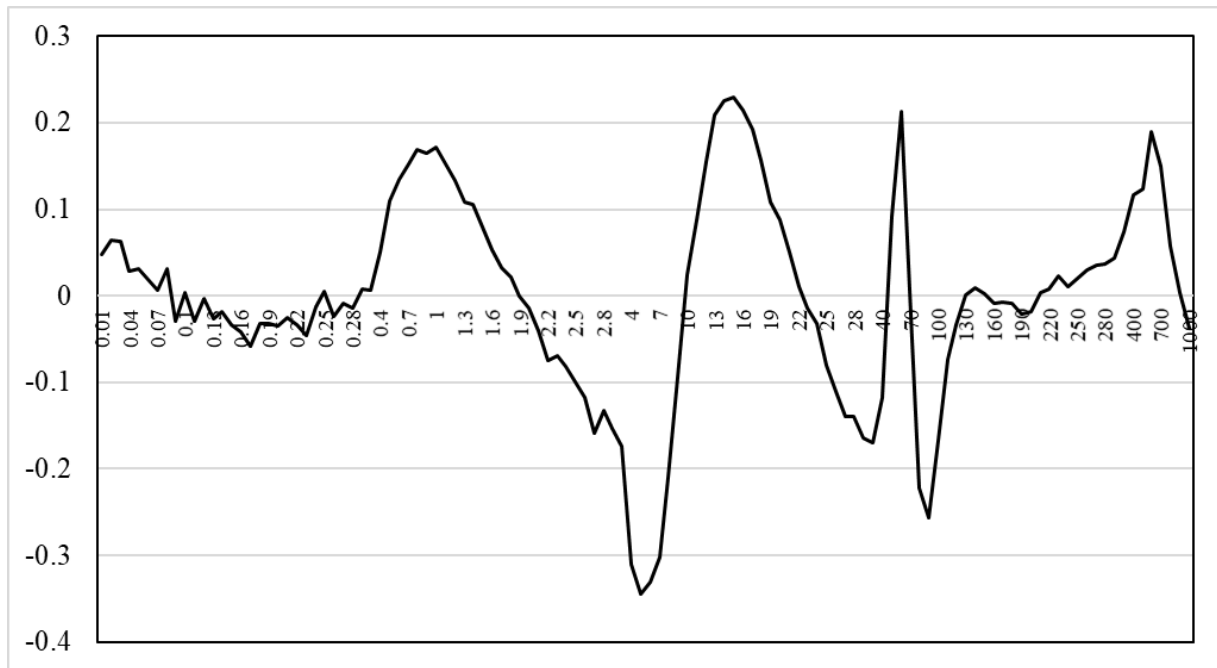
Više apsolutne vrijednosti pondera u modelu uočene su za native signale indukcije fluorescencije klorofila *a* (Fm, F4 i F5), parametre izvedene iz krivulje tranzijenata (T za Fm, te prijelazne signale od F1 do F5) i tokove elektrona izražene po poprečnom presjeku. Biofizičke interpretacije parametara nalaze se u **Prilogu 1**.

U modelu s 118 mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* utvrđeno je postepeno smanjenje vrijednosti RMSEP dodavanjem latentnih varijabli, a zatim porast do 48 latentne varijable, nakon čega dodavanje varijabli više nije utjecalo na porast varijance objašnjene modelom (**Grafikon 13**). Apsolutno najniža vrijednost RMSEP ostvarena je u modelu s 10 latentnih varijabli i iznosila je 2,182.



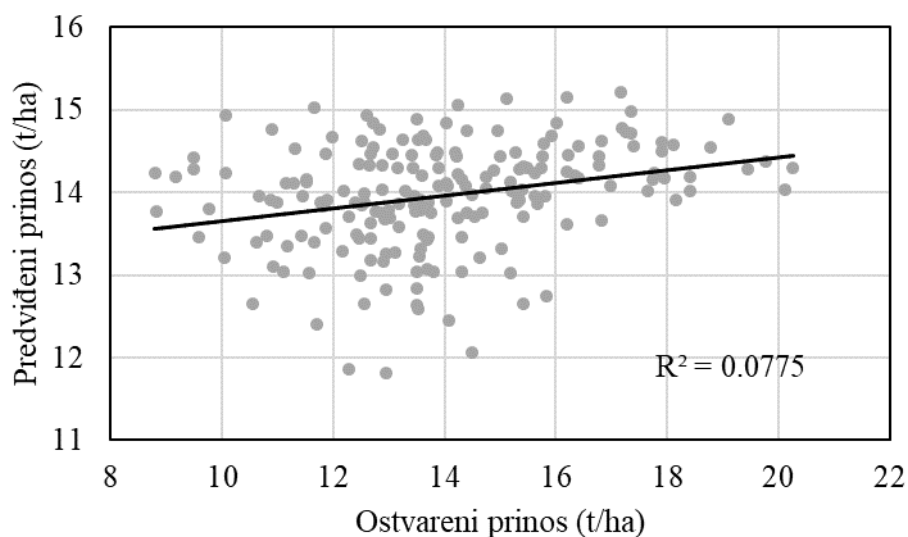
Grafikon 13. Iznos greške modela (RMSEP) s tranzijentima fluorescencije klorofila *a* kao prediktorima s povećanjem broja latentnih varijabli.

Vrijednosti pondera u modelu s 10 latentnih varijabli bile su više kod koraka J, I i P, te na prijelazu iz platoa J u plato I, te prilikom približavanja vrijednosti maksimalnom intenzitetu fluorescencije (**Grafikon 14**).



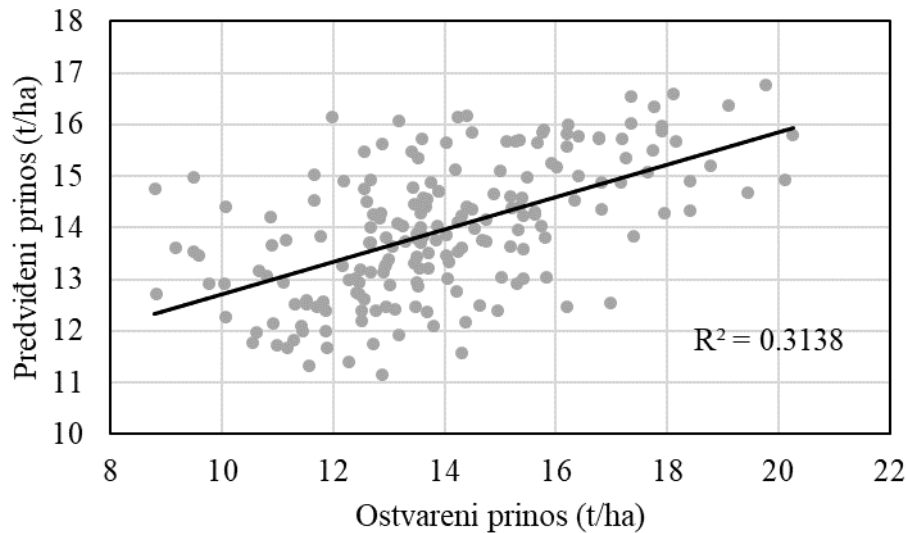
Grafikon 14. Vrijednosti pondera tranzijenata fluorescencije klorofila *a* u PLS modelu s deset latentnih varijabli za predviđanje prinosa zrna.

Model s četiri latentne varijable koji je koristio biofizičke parametre fluorescencije klorofila *a* kao prediktore, pokazao je nisku prediktivnu sposobnost objasnivši 7,75% ukupne varijance za prinos zrna (**Grafikon 15**).



Grafikon 15. Vrijednosti prinosa zrna predviđene kalibriranim PLS modelom korištenjem 58 biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a*.

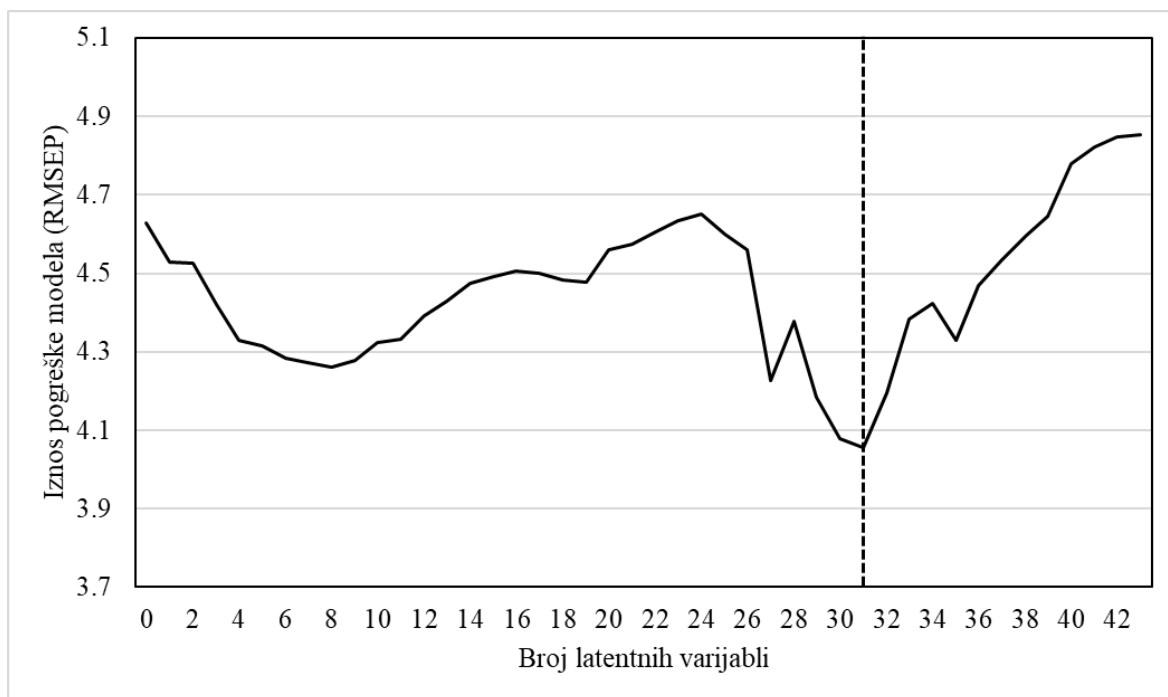
Model s 10 latentnih varijabli u kojem su kao prediktori korišteni 118 mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* pokazao je višu prediktivnu sposobnost objasnivši 31,38% ukupne varijance prinosa zrna (**Grafikon 16**).



Grafikon 16. Vrijednosti prinosa zrna predviđene kalibriranim PLS modelom korištenjem 118 tranzijenata fluorescencije klorofila *a*.

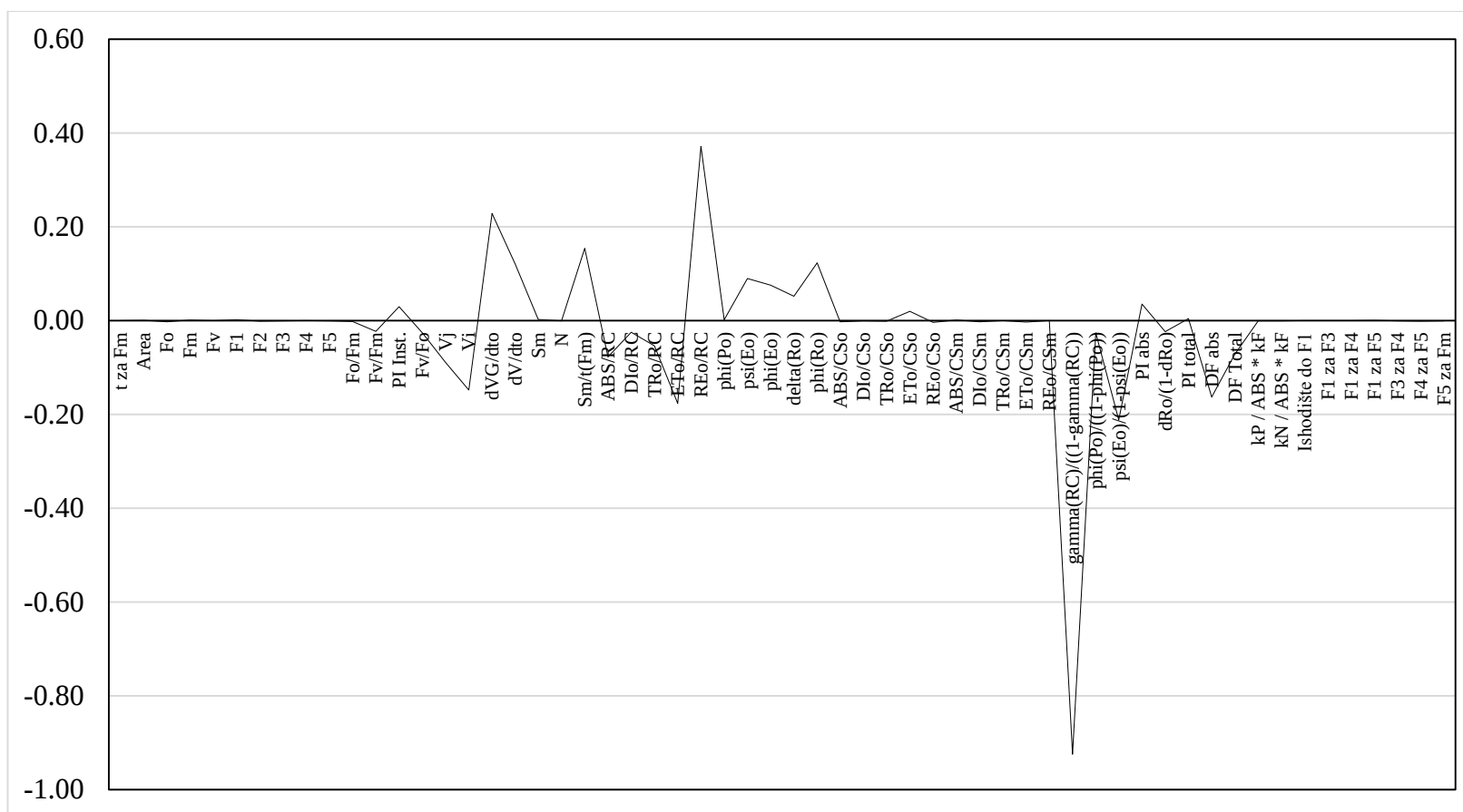
3.9. Statistički modeli za predviđanje vlage zrna u berbi

Korištenjem 58 biofizičkih parametara za predviđanje vlage zrna u berbi, utvrđene su nestabilne vrijednosti RMSEP s porastom broja latentnih varijabli. Ukupno je procijenjeno 43 latentne varijable, a najniža je vrijednost RMSEP (4,057) ostvarena sa 31 latentnom varijablom (**Grafikon 17**), te je stoga taj model smatran kalibriranim modelom i korišten za predviđanje vrijednosti vlage zrna u berbi.



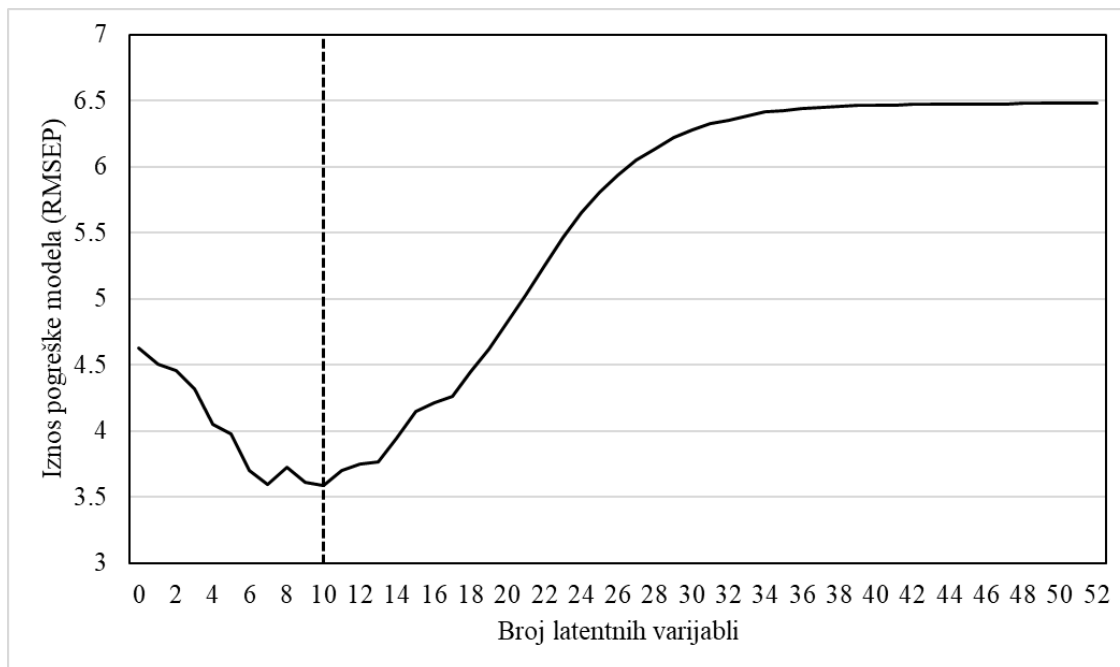
Grafikon 17. Iznos greške modela (RMSEP) s biofizičkim parametrima fluorescencije klorofila *a* kao prediktorima povećanjem broja latentnih varijabli.

Vrijednosti pondera modela za predviđanje vlage zrna u berbi s biofizičkim parametrima fluorescencije klorofila *a* razlikovale su se od vrijednosti pondera u modelu za predviđanje prinosa zrna (**Grafikon 18**). Najviša vrijednost pondera ostvarena je za parametar $\frac{Y_{RC}}{1-Y_{RC}}$ koji predstavlja vjerojatnost da molekula klorofila fotosustava II funkcionira kao reakcijsko središte. Apsolutne vrijednosti pondera više od 0,2 uočene su također za parametre d_{VG}/d_{To} koji predstavlja nagib krivulje fluorescencije pri ishodištu, te RE_0/RC koji predstavlja vjerojatnost da tok elektrona svakog reakcijskog središta reducira krajnje akceptore elektrona na strani fotosustava I.



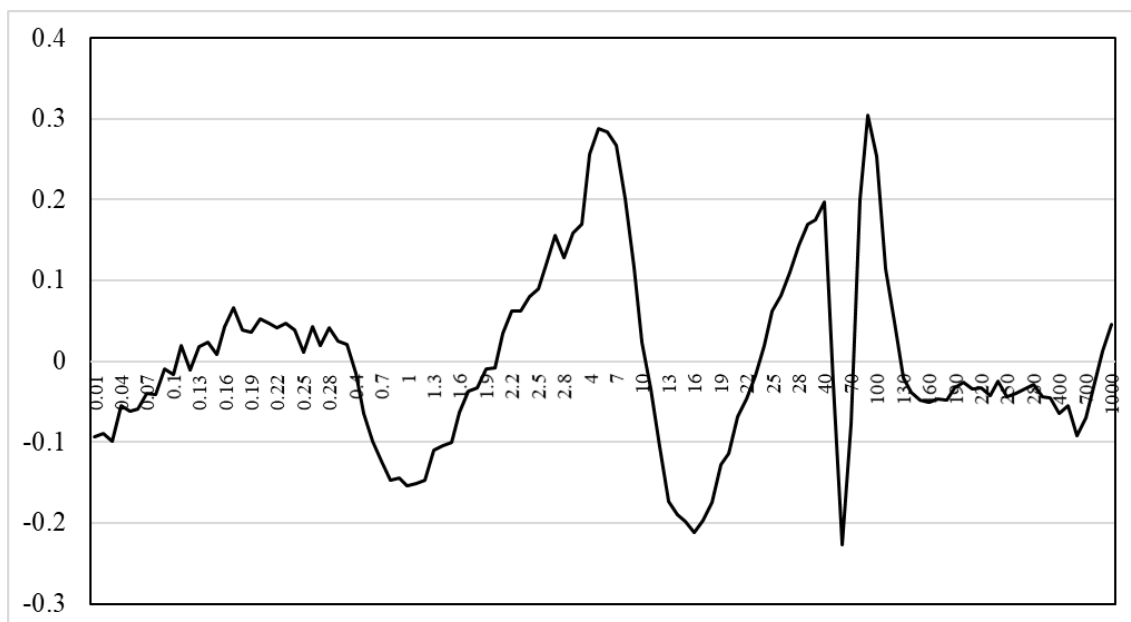
Grafikon 18. Vrijednosti pondera pojedinih biofizičkih parametara fluorescencije klorofila a u PLS modelu s četiri latentne varijable za predviđanje vlage zrna u berbi.

U modelu sa 118 mjerenih tranzijenata procijenjene su ukupno 52 latentne varijable. Vrijednosti RMSEP modela opadale su do 10. komponente, dok je od 10. do 52. komponente utvrđen porast vrijednosti (**Grafikon 19**). Najniža apsolutna vrijednost RMSEP ostvarena je u modelu s 10 latentnih varijabli (3,591), te je taj model korišten za predviđanje svojstva.



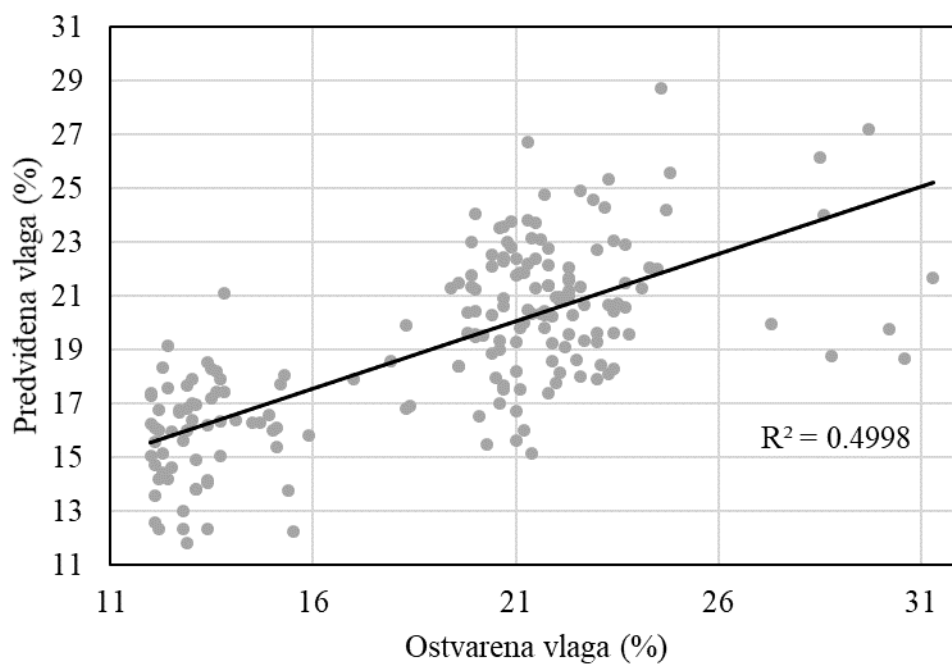
Grafikon 19. Iznos greške modela za predviđanje vlage zrna u berbi (RMSEP) s tranzijentima fluorescencije klorofila *a* kao prediktorima s povećanjem broja latentnih varijabli.

Uzorak vrijednosti pondera tranzijenata fluorescencije klorofila *a* u modelu za predviđanje vlage zrna bio je sličan uzorku u modelu za predviđanje prinosa zrna, sa slabije izraženim vrijednostima za P korak, tj. maksimalnu fluorescenciju (**Grafikon 20**). Najviše apsolutne vrijednosti pondera u ovom modelu bile su oko 0,3.



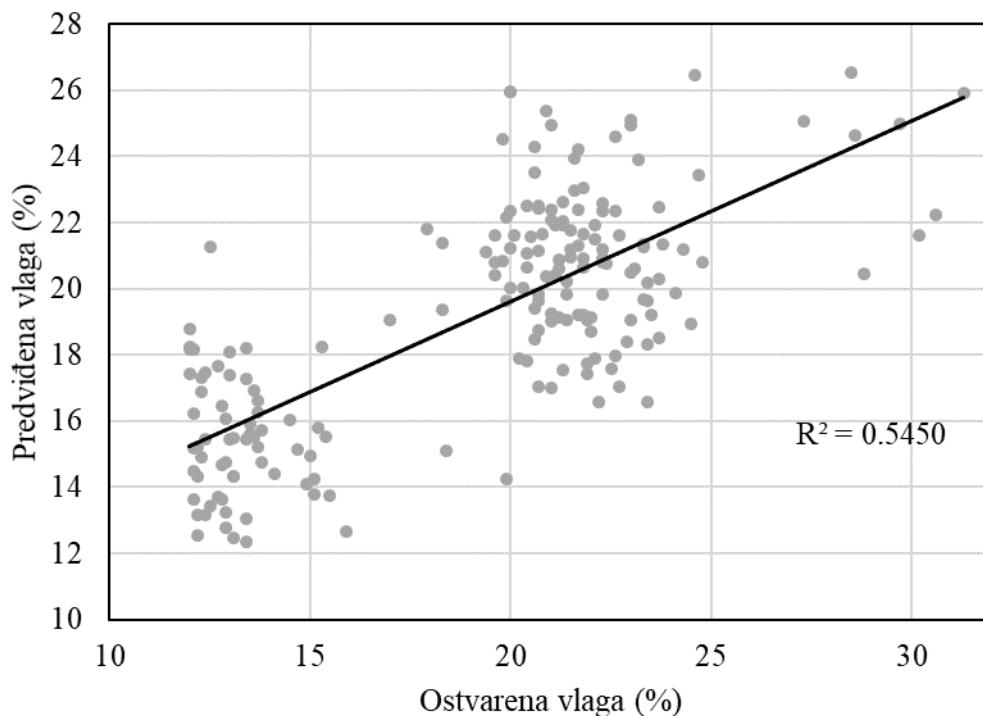
Grafikon 20. Vrijednosti pondera tranzijenta fluorescencije klorofila *a* u PLS modelu s deset latentnih varijabli za predviđanje vlage zrna u berbi.

Model s 31 latentnom varijablom u kojem su korišteni biofizički parametri fluorescencije klorofila *a* kao prediktori pokazao je umjerenu prediktivnu sposobnost objasnivši 49,98% ukupne varijance za svojstvo (**Grafikon 21**).



Grafikon 21. Vrijednosti vlage zrna u berbi predviđene kalibriranim PLS modelom korištenjem 58 biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a*.

Kalibrirani model koji je koristio 118 mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* za predviđanje vlage zrna u berbi pokazao je višu prediktivnu sposobnost objasnivši 54,5% ukupne varijance za svojstvo korištenjem samo 10 latentnih varijabli (**Grafikon 22**).



Grafikon 22. Vrijednosti vlage zrna u berbi predviđene kalibriranim PLS modelom korištenjem 118 tranzijenata fluorescencije klorofila *a*.

3.10. Komponente varijance predviđenih svojstava

Analiza komponenata varijance mješovitim modelom pokazala je komponente genetičke varijance različite od nule za sva predviđena svojstva, osim varijance genotip - okolina za prinos te genetičke varijance za vlagu zrna predviđenu korištenjem mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* (**Tablica 9**). Znatni udjeli varijance objašnjene okolinom opaženi su kod svih predviđenih svojstava. Varijanca objašnjena interakcijom genotip – okolina bila je viša od varijance objašnjene genotipom kod vlage zrna predviđene korištenjem biofizičkih parametara i prinosa zrna predviđenog tranzijentima. Procijenjene su niske do umjerene vrijednosti heritabilnosti za sva predviđena svojstva osim za vlagu zrna

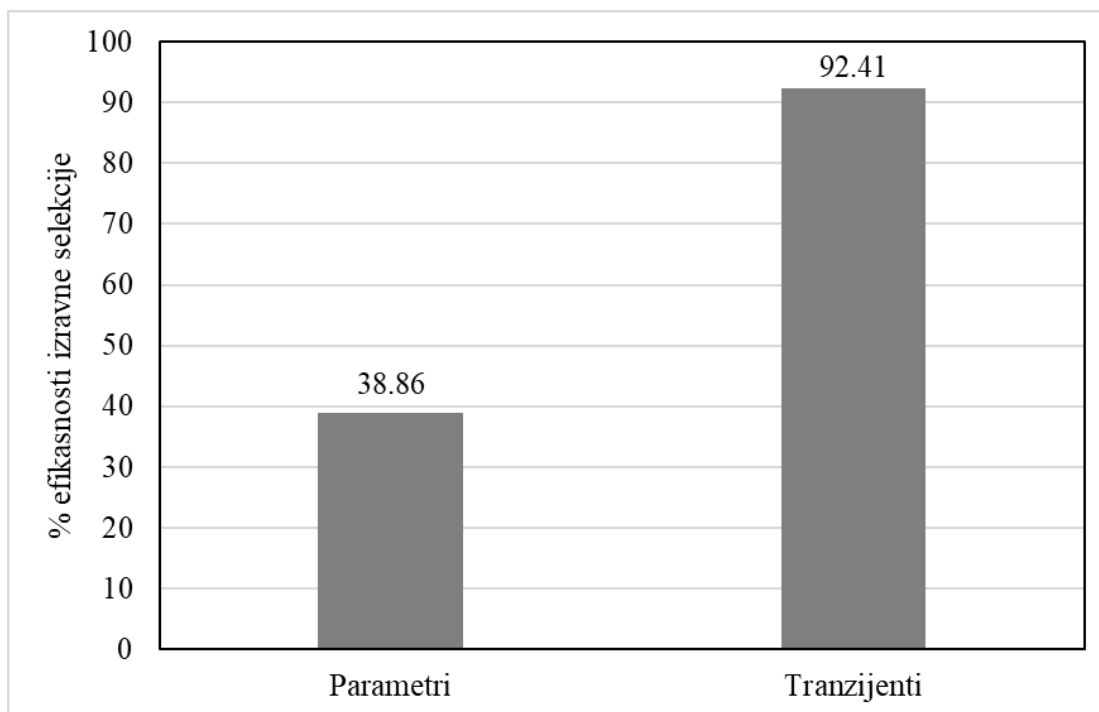
predviđenu tranzijentima za koju je procijenjen iznos varijance objašnjene genotipom od 0,00. Iznosi genetičkih korelacija s izvornim svojstvom varirali su od niskih do vrlo visokih. U modelima koji su koristili biofizičke parametre, ostvarena je umjerena do niska genetička korelacija s izvornim svojstvom (0,44) s visokim iznosom greške procjene (0,45). Snaga genetičke korelacije vlage zrna predviđenog biofizičkim parametrima i izvornog svojstva bila je jaka do vrlo jaka (0,83) uz vrlo visok iznos greške procjene (1,05). Najviša genetička korelacija s izvornim svojstvom ostvarena je kod prinosa zrna predviđenog korištenjem mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* (0,97).

Tablica 9. Komponente varijance, heritabilnosti i korelacije s izvornim svojstvima za predviđene vrijednosti prinosa i vlage zrna

Komponenta varijance	Prinos - parametri	Vlaga - parametri	Prinos - tranzijenti	Vlaga - tranzijenti
σ^2_G	0.036	0.297	0.080	0.000
σ^2_E	0.191	8.053	1.156	10.087
$\sigma^2_{G \times E}$	0.000	0.817	0.137	1.650
σ^2_e	0.233	4.198	0.409	2.996
H^2	0.65 ± 0.16	0.32 ± 0.28	0.50 ± 0.23	—
r_G	0.44 ± 0.45	0.83 ± 1.05	0.97 ± 0.36	—

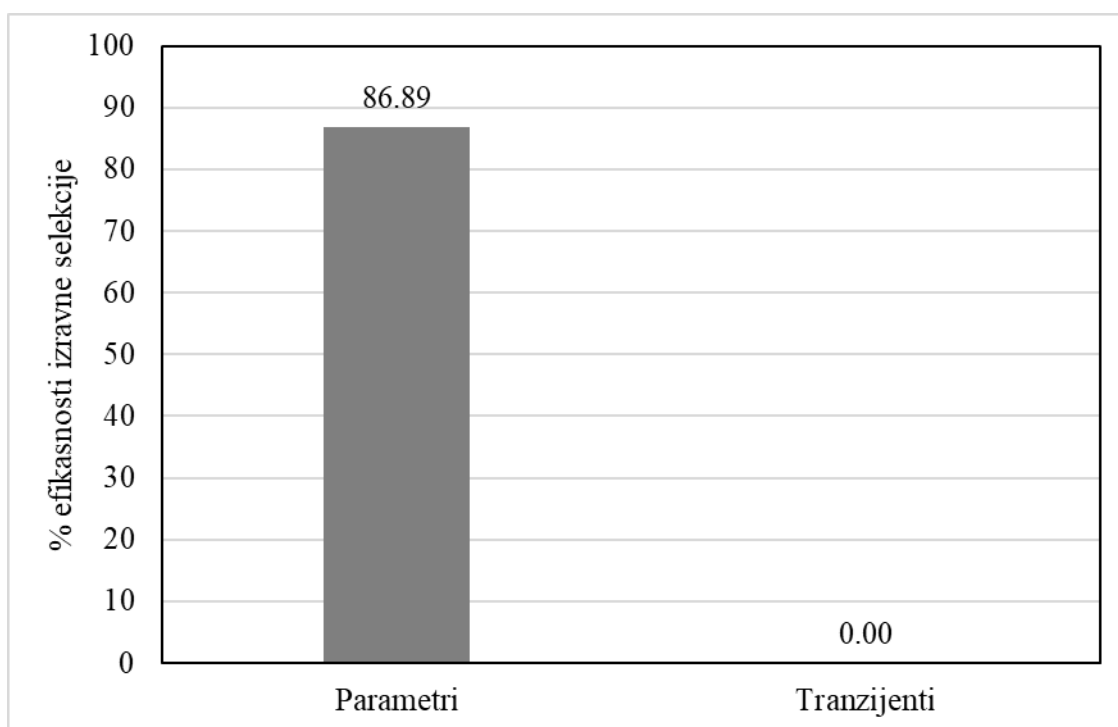
* σ^2_G predstavlja varijancu objašnjenu genotipom, σ^2_E varijancu objašnjenu okolinom, $\sigma^2_{G \times E}$ varijancu objašnjenu interakcijom genotip-okolina, σ^2_e varijancu greške modela, H^2 heritabilnost, a r_G genetičku korelaciju s izvornim svojstvom

Efikasnost indirektna selekcije za prinos zrna putem vrijednosti predviđenih korištenjem biofizičkih parametara bila je niža u odnosu na efikasnost korištenjem vrijednosti predviđenih korištenjem tranzijenata fluorescencije klorofila *a* (**Grafikon 23**). Efikasnost indirektna selekcije korištenjem biofizičkih parametara iznosila je 38,86 % efikasnosti izravne selekcije, dok je korištenjem tranzijenata ostvarena visoka efikasnost od 92,41 % efikasnosti izravne selekcije.



Grafikon 23. Efikasnosti indirektne selekcije za prinos zrna putem vrijednosti predviđenih modelom korištenjem biofizičkih parametara i tranzijenata fluorescencije klorofila *a*.

Efikasnost indirektne selekcije za vlagu zrna u berbi putem vrijednosti predviđenih korištenjem biofizičkih parametara bila je relativno visoka ostvarujući 86,89% efikasnosti izravne selekcije za svojstvo (**Grafikon 24**). S obzirom na izostanak procjene komponente varijance objašnjene genotipom u predviđanjima korištenjem tranzijenata, ti podatci ne mogu biti korišteni za indirektnu selekciju za svojstvo.



Grafikon 24. Efikasnosti indirektne selekcije za vlagu zrna u berbi putem vrijednosti predviđenih modelom korištenjem biofizičkih parametara i tranzijenata fluorescencije klorofila a.

4. RASPRAVA

4.1. Analiza varijance agronomskih svojstava

Visoki prinosi zrna kukuruza ostvareni u pokusima uzrokovani su ponajprije dobrom prilagođenosti moderne germplazme kukuruza na visoko-intenzivne uvjete uzgoja. Primjerice, u periodu od kraja 1970-ih godina do 2010. gnojidba dušikom po jedinici površine u Sjedinjenim Američkim Državama ostala je gotovo jednaka, dok je zabilježen porast prinosa od preko 50% (**Haeghele i sur.**, 2013.). Autori porast prinosa pripisuju uspješnom procesu selekcije za efikasnost iskorištavanja dušika i odgovor biljaka na pojačanu gnojidbu dušikom. Učinci bolje efikasnosti iskorištavanja dušika doprinijeli su porastu prinosa iz više perspektiva, a ponajprije sprječavanjem pojave jalovosti biljaka te porastom broja i veličine zrna po jedinici površine. Visine prinosa ostvarene u navedenom istraživanju usporedive su s visinama prinosa u ovom istraživanju.

Porast prinosa u oplemenjivačkim programima pokazatelj je njihova uspjeha. Za očekivati je da uz stalan pritisak selekcije odaziv na selekciju bude pozitivan te da najnovija germplazma poput eksperimentalnih hibrida korištenih u ovom istraživanju ostvaruje više vrijednosti agronomskih svojstava u odnosu na staru (**Ci i sur.**, 2011.). Povezanost porasta prinosa i godine priznavanja hibrida izraženija je u visoko-prinosnim okolinama, dok u okolinama ispodprosječnog očekivanog prinosa s lošijim tlima, slabom gnojidbom ili neoptimalnim sklopovima i rokovima sjetve ta povezanost ne postoji (**Assefa i sur.**, 2018.). Porast prinosa jednim se dijelom može objasniti smanjenjem broja nisko prinosnih i srednje prinosnih okolina, putem promjena u agrotehnici, dok se u drugom dijelu objašnjava uspješnim oplemenjivačkim napretkom. Stoga je očekivano da se u budućnosti kod korištenja modernih hibrida razlika u prinosu između nisko i srednje prinosnih okolina te okolina visokog i vrlo visokog potencijala rodosti poveća uz nastavak trenda smanjivanja broja nisko i srednje prinosnih okolina (**Assefa i sur.**, 2017.). Okoline na površinama Poljoprivrednog instituta Osijek mogu biti smatrane vrlo prinosnim okolinama u odnosu na podatke o prosječnom prinosu kukuruza od 2010. – 2017. godine u Republici Hrvatskoj od 7,0, 5,7, 4,3, 6,5, 8,1, 6,5, 8,5 i 6,3 t/ha (**Statistički ljetopis Republike Hrvatske**, 2018.).

Autori **Wang i sur.** (2011.) navode kako je porast prinosa u Kini između 1960-ih i 2000-ih godina ovisio o nekoliko čimbenika, a kao najvažniji se pokazuje korištenje germplazme razvijene u američkom kukuruznom pojasu (eng. *Corn belt*) koja je također sastavni dio oplemenjivačkih programa Poljoprivrednog instituta Osijek.

U ovome istraživanju utvrđene su statistički značajne razlike između godina. Između prosječnog prinosa u 2017. i 2019. godini nije bilo razlika, dok se obje godine značajno razlikuju od 2018. godine. Vjerojatni čimbenik koji je utjecao na ove razlike su iznadprosječne temperature zraka i brzo nakupljanje toplinskih jedinica u periodu nakon sjetve u 2018. godini, što je uzrokovalo skraćivanje perioda od sjetve do cvatnje za sedam dana u odnosu na preostale dvije godine. Na taj način su hibridi u pokusu u 2018. godini imali manje poteškoća s rastom i razvojem u periodu koji je kritičan u pogledu nedostatka vode i visokih temperatura te nakon pune zriobe ostvarili prinos za 2,6 t/ha veći nego u obje preostale godine. Povoljan temperaturni režim koji izravno utječe na nakupljanje toplinskih jedinica jedan je od presudnih čimbenika proizvodnji kukuruza. Odstupanje temperatura od prosjeka, odnosno visoke temperature često dovode do skraćivanja vegetacije, rane zriobe i smanjivanja prinosa (**Waqas i sur.**, 2021.). Isto tako, utvrđene su statistički značajne razlike između hibrida kroz sve tri godine te se na osnovu toga hibridi mogu podijeliti u dvije skupine, jednu s više prinostnim hibridima (H2, H4, H6, H7, H9, H10, H12, H13, H14, H15 i H16) i drugu s niže prinostnim hibridima (H1, H3, H8, H11). Razlike između ove dvije skupine mogu se pripisati variranju genotipa, godine i ponavljanja, što u prvi plan ističe stabilnije hibride koji su kroz sve tri godine ostvarili relativno visoke prinose.

Po pitanju vlage zrna u berbi izrazito velika i statistički značajna razlika zabilježena je između 2018. i ostalih godina (13,3 nasuprot 21,5 i 22,6 %) , što se kao i kod prinosa može povezati s čimbenikom bržeg nakupljanja toplinskih jedinica u ranijem dijelu vegetacije, bržom zriobom i posljedično nižom vlagom u berbi. Kako je berba pokusa 2018. godine obavljena 2. listopada, što je dan kasnije od 2019. i tjedan dana ranije od 2017. godine, može se isključiti čimbenik kasnije berbe (kiša, vlažno tlo, kvarovi mehanizacije i drugi uzroci), koji bi inače svakako doprinio razlikama između godina. Vrlo niska vlaga hibrida H3, koji je ujedno imao i najmanji prinos, vrlo vjerojatno ukazuje na nižu skupinu zriobe u odnosu na ostale hibride. Visoka statistička značajnost interakcije genotipa i godine ističe važnost godine u pogledu svojstva vlage zrne u berbi.

4.2. Analiza varijance svojstava fotosintetičke učinkovitosti

Goltsev i sur. (2016) pružili su pregled metodologije i teorijske osnove za pravilno tumačenje rezultata dobivenih korištenjem fluorescencije klorofila *a* u biljkama. Autori su istaknuli da analiza fluorescencije klorofila *a* pruža pouzdane informacije o stanju biljaka, posebno u odnosu na stresne uvjete. Fluorescencija klorofila *a* uglavnom potječe od antenskih kompleksa fotosustava II (PSII), ali ovisi o procesima u pigmentnoj matrici ili reakcijskim centrima PSII-a, kao i o oksido-redukcijskim reakcijama na davačkoj i akceptorskoj strani PSII-a te čak i u cijelom lancu prijenosa elektrona. Pristupi obradi i analizi krivulja indukcije fluorescencije detaljno se razmatraju na temelju teorije energetskog toka u fotosintetskom aparatu koju je razvio prof. Reto J. Strasser, poznat kao "JIP-test".

Parametar F_v/F_m , koji je korišten kao jedan od pokazatelja u ovom istraživanju, koji predstavlja kvantnu efikasnost primarne fotokemije u fotosustavu II, ima važnu ulogu u istraživanju tolerancije kukuruza na sušni stres, kako je prikazano u istraživanju **Badr i Bruggemann** (2020). U tom istraživanju, F_v/F_m je korišten zajedno s indeksom učinkovitosti (PI) kako bi se procijenila sposobnost fotosintetskog aparata za prikupljanje svjetlosne energije. Deset različitih kultivara kukuruza praćeno je relativnim sadržajem vode u listu (RWC) i sadržajem vode u tlu (SWC). Rezultati istraživanja pokazali su da su vrijednosti F_v/F_m , PI i RWC značajno smanjene kod biljaka izloženih sušnom stresu. Analiza indukcije fluorescencije klorofila *a*, koja prikazuje promjenu fluorescencije od osnovne tamno prilagođene razine do maksimalne (OJIP tranzijent), omogućila je razlikovanje pristupa Zea 1006 iz Libije i Zea 612 iz Italije kao najtolerantnijih i najmanje tolerantnih genotipova. Koristeći analizu glavnih komponenti (PCA) i metode klasteriranja na temelju vrijednosti F_v/F_m , PI, RWC i SWC, genotipovi kukuruza iz Egipta i Libije su se razlikovali od genotipova iz Europe, Rusije i SAD-a. Ovi rezultati ukazuju na važnost parametra F_v/F_m kao pokazatelja tolerancije kukuruza na sušni stres te mogućnosti klasifikacije genotipova na temelju ove vrijednosti u istraživanju tolerancije na sušu. U kontekstu ove disertacije, ovi rezultati pokazuju važnost parametara fluorescencije u klasifikaciji hibrida i okolina prema kvaliteti i stresu.

Rezultati istraživanja **Ahmad i sur.** (2021) sugeriraju mogućnost korištenja parametara fluorescencije za predviđanje prinosa u statističkim modelima, što je u ovome radu jedna

od postavki (izrada regresijskog modela sa svojstvima fluorescencije klorofila a kao prediktorima i agronomskim svojstvima kao zavisnim varijablama).

Veliki broj autora istraživao je različite utjecaje okoline na fluorescenciju klorofila (**Gao i sur.**, 2022.; **Zheng i sur.**, 2022.; **Wang i sur.**, 2023.a) te se može zaključiti da parametri fluorescencije klorofila pokazuju određeni stupanj prediktivnosti kod kukuruza u poljskim uvjetima. U okviru ovoga istraživanja parametar F_v/F_m korišten je kao prediktor najvažnijih agronomskih svojstava u selekciji kukuruza, a korelacije s prinosom i vlagom zrna bile su vrlo slabe pozitivne (Pearsonova korelacija) dok su genetičke korelacije s prinosom bile slabo pozitivne (prinos) i umjerene negativne (vlaga zrna). Parametar PI_{ABS} kao jedan od glavnih parametara fluorescencije bio je u vrlo slaboj pozitivnoj (prinos) i negativnoj (vlaga zrna) korelaciji (prema Pearsonu) s agronomskim svojstvima, a u vrlo slaboj negativnoj genetičkoj korelaciji s oba agronomska svojstva. Hibridi H1, H2, H9 i H14 ostvarili su značajno najviše vrijednosti F_v/F_m , od čega su hibridi H2, H9 i H14 svrstani u visokoprinosnu skupinu, a hibrid H1 u niskoprinosnu. Hibrid H8 s niskim vrijednostima F_v/F_m i PI_{ABS} svrstan je u niskoprinosnu skupinu. Značajne razlike između hibrida H14 i H15 u vrijednostima F_v/F_m zanimljive su jer je riječ o dva strana hibrida koji su korišteni kao standardi. Utvrđene korelacije i varijabilnost oba fotosintetička parametra (F_v/F_m i PI_{ABS}) kroz tri godine istraživanja, što je u suglasju s mnogim drugim studijama (**Lepeduš i sur.**, 2012.; **Šimić i sur.**, 2014.; **Gao i sur.**, 2022.; **Zheng i sur.**, 2022., **Wang i sur.**, 2023.a), pokazuju informativnost u pogledu procjene stanja usjeva, a posljedično i njegovo modeliranje. Visoke srednje vrijednosti temperature zraka tijekom lipnja i srpnja utjecale su na variranje parametara fluorescencije klorofila. Ovakva istraživanja mogu pružiti nove uvide u mehanizme prilagodbe usjeva visokim temperaturama te poslužiti kao referenca za uzgoj kultivara tolerantnih na stresne abiotske utjecaje (posebno visoke temperature i manjak vode), kao i učinkovito upravljanje navodnjavanjem, koje je u mnogim uzgojnim područjima relativno nova, ali uslijed klimatskih promjena sve potrebija agrotehnička mjera.

4.3. Analiza učinkovitosti modela za predviđanje prinosa

Predviđanje prinosa i vlage zrna u kontekstu ciljeva ovog istraživanja ima ključnu važnost iz nekoliko razloga. Prvo, utvrđivanje postojanja genetičke varijabilnosti u svojstvima

fluorescencije klorofila *a* kod različitih eksperimentalnih i komercijalnih hibrida kukuruza omogućuje identifikaciju genotipova s poželjnim svojstvima fotosinteze. Drugo, istraživanje genetičkih korelacija između tih svojstava i agronomskih svojstava kukuruza te struktura varijance pomaže razumijevanju veza između fizioloških procesa i agronomskih performansi. Treće, izrada penaliziranog regresijskog modela koji koristi svojstva fluorescencije klorofila *a* kao prediktore i agronomska svojstva kao zavisne varijable omogućuje predviđanje prinosa i vlage zrna na temelju fizioloških karakteristika biljaka. Time se otvara mogućnost planiranja križanja i odabira najboljih potomstava tijekom sezone, čime se optimizira korištenje resursa i skraćuje ciklus dobivanja novih hibrida. Konačno, procjena efikasnosti posredne selekcije putem predviđanja penaliziranim regresijskim modelom omogućuje usporedbu s izravnom selekcijom te pruža smjernice za poboljšanje procesa selekcije i oplemenjivanja kukuruza. Ovo istraživanje ima potencijal unaprijediti produktivnost i prilagodljivost kukuruza na nepovoljne uvjete te doprinijeti razvoju efikasnijih metoda uzgoja i oplemenjivanja usjeva.

Heritabilnost je mjera koliko je varijabilnost određene osobine u populaciji uzrokovana genetičkim faktorima (**Hallauer i sur.**, 2010.). U kontekstu provedenog istraživanja, analizirane su komponente varijance za prinose, vlagu, F_v/F_m i PI_{ABS} (parametri fluorescencije klorofila *a* u kukuruzu. Utvrđene heritabilnosti su u suglasju s heritabilnostima za ova svojstva objavljenima u literaturi (**Galic i sur.**, 2019.a; **Yi i sur.**, 2021.). Utvrđene genetičke korelacije između agronomskih svojstava i svojstava fluorescencije bile su niske, no zbog sagledivosti podataka i dostatnih literaturnih izvora, u kontekstu varijance i genetičkih korelacija analizirana su samo dva svojstva fluorescencije (F_v/F_m i PI_{ABS}), dok je za izradu modela korišten puni set podataka sa svim parametrima i tranzijentima.

U provedenom istraživanju povećanjem broja latentnih varijabli povećavala se i vrijednost RMSEP, što ukazuje na pogoršanje prediktivne točnosti modela. To može biti posljedica prekomjerne složenosti modela ili nedostatka dovoljno informacija za precizno predviđanje (**Mevik i Wehrens**, 2007.). Odabir modela s 4 latentne varijable temeljio se na postizanju najniže vrijednosti RMSEP. Međutim, važno je uzeti u obzir i druge faktore pri odabiru modela, poput interpretabilnosti, jednostavnosti i praktične primjene. Također, provedena je dodatna validacija modela kako bi se potvrdila njegova prediktivna snaga na neovisnom skupu podataka. Ukratko, analiza je pokazala da se najniža vrijednost RMSEP postiže s

modelom koji koristi 4 latentne varijable za predviđanje prinosa zrna. Međutim, važno je provesti daljnju validaciju i usporediti rezultate s drugim modelima kako bi se potvrdila prediktivna snaga ovog pristupa. Također je važno uzeti u obzir i druge faktore pri odabiru modela te provesti dodatne analize vezane uz uporabu fluorescencije klorofila *a* kao prediktora agronomskih svojstava kukuruza.

U skladu s rezultatima provedenog istraživanja, model s 10 latentnih varijabli koji je koristio 118 mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* pokazao je višu predikcijsku sposobnost u usporedbi s modelom s četiri latentne varijable koji je koristio biofizičke parametre fluorescencije klorofila *a*. U istraživanju **Galića i sur.** (2020.) autori su koristili podatke fluorescencije u predikcijskim modelima kako bi istražili utjecaj slanog stresa na nakupljanje biomase biljaka kukuruza. Autori su utvrdili da je korištenje 118 tranzijenata pokazalo veću, iako usporedivu, predikcijsku sposobnost nego 18 odabranih JIP parametara.

Rezultati provedenog istraživanja u dijelu analize učinkovitosti modela za predviđanje prinosa sukladni su drugim sličnim istraživanjima. Na primjer, **Yu i sur.** (2021) su utvrdili da je njihov model za predviđanje biomase uspio objasniti 7 % do 19 % ukupne varijance. **Spyroglou i sur.** (2021) postigli su točnost od preko 50 % u predviđanju biomase koristeći kombinaciju NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*) i fluorescencije. **Galić i sur.** (2019.a) postigli su objašnjenje varijance od 35 % u predviđanju odabranih agronomskih svojstava.

U usporedbi s citiranim istraživanjima, rezultati provedenog istraživanja pokazuju da model s 10 latentnih varijabli ima znatno veću prediktivnu sposobnost od ostalih modela. Objasnio je veći postotak ukupne varijance za prinos zrna u usporedbi s prethodno navedenim studijama. Ovi rezultati ukazuju na visoku vrijednost i prediktivnu moć modela koji se temelji na mjerenim tranzijentima fluorescencije klorofila *a* za predviđanje agronomskih svojstava kukuruza. Provedeno istraživanje pokazuje obećavajuće rezultate u pogledu predviđanja prinosa zrna kukuruza koristeći fluorescenciju klorofila *a*, nadmašujući neka prethodna istraživanja u postizanju veće objašnjenosti varijance.

Na temelju analize pondera u modelima, važnost pojedinih parametara za predviđanje prinosa zrna je istaknuta. Više apsolutne vrijednosti pondera u modelu primijećene su za određene signale indukcije fluorescencije klorofila *a* (Fm, F4 i F5), parametre izvedene iz

krivulje tranzijenata (T za Fm, te prijelazne signale od F1 do F5) i tokove elektrona izražene po poprečnom presjeku. Ovo ukazuje na njihovu značajnost u objašnjavanju varijabilnosti prinosa zrna. Dodatno, analiza modela s 118 mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* pokazala je postepeno smanjenje vrijednosti pogreške (RMSEP) s povećanjem broja latentnih varijabli u modelu. Nakon 48 latentnih varijabli, dodavanje dodatnih varijabli više nije imalo značajan utjecaj na povećanje objašnjene varijance modela. Najniža apsolutna vrijednost RMSEP-a, koja iznosi 2,182, postignuta je u modelu s 10 latentnih varijabli. To ukazuje na pouzdanost tog modela u predviđanju prinosa zrna. Također, vrijednosti pondera u modelu s 10 latentnih varijabli su bile više za korak J, I i P, te pri prijelazu iz platoa J u plato I, kao i prilikom približavanja maksimalnom intenzitetu fluorescencije. Ovi rezultati upućuju na važnost tih parametara u vezi s fotosintetskom učinkovitošću i predviđanju prinosa zrna.

4.4 Analiza učinkovitosti modela za predviđanje vlage zrna

Predviđanje vlage zrna u berbi, kao pokazatelja tehnološke zrelosti kukuruza, ima veliku važnost u proizvodnji kukuruza iz nekoliko razloga. Prvo, točno predviđanje vlažnosti zrna omogućava pravilno planiranje i organizaciju berbe. Zrna kukuruza trebaju biti optimalno suha kako bi se izbjegli problemi kao što su gubitak kvalitete, smanjenje prinosa, povećana potrošnja energije i oštećenja tijekom skladištenja. Osim toga, precizno praćenje vlažnosti zrna omogućuje agronomima i poljoprivrednim proizvođačima donošenje odluke o optimalnom vremenu berbe kako bi se postigao najbolji prinos i kvaliteta zrna.

U kontekstu rezultata provedenog istraživanja, ističe se važnost korištenja biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a* za predviđanje vlažnosti zrna u berbi kukuruza. Model s 31 latentnom varijablom pokazao je umjerenu prediktivnu sposobnost objašnjavajući gotovo 50 % ukupne varijance za to svojstvo. Ovo sugerira da ti parametri mogu biti korisni prediktori vlažnosti zrna i mogu pružiti vrijedne informacije o tehnološkoj zrelosti kukuruza. Međutim, kalibrirani model koji je koristio 118 mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* pokazao je još bolju prediktivnu sposobnost. Samo s 10 latentnih varijabli, taj model je objasnio 54,5 % ukupne varijance za svojstvo vlažnosti zrna u berbi. To ukazuje da odabir optimalnih parametara i njihova integracija u model može značajno poboljšati preciznost predviđanja vlažnosti zrna. Ovi rezultati sugeriraju da

korištenje biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a*, posebice tranzijenata fluorescencije, može biti korisno u predviđanju vlažnosti zrna u berbi kukuruza. Rezultati pružaju temelje za daljnja istraživanja i razvoj metoda koje će omogućiti precizno praćenje i predviđanje tehnološke zrelosti kukuruza radi optimizacije berbe i postizanja visokog prinosa i kvalitete zrna.

Istraživanja koja se bave predviđanjem vlažnosti zrna u berbi kukuruza su rijetka i često su ograničena na neposredno predviđanje. Ograničenja takvih studija leže u tome što ne uzimaju u obzir važne faktore kao što su senescencija i zrelost biljke tijekom razvoja. Međutim, nedavna studija provedena od strane **Spišića i sur. (2022.)** naglašava važnost korištenja proksimalnih metoda mjerenja fluorescencije za predviđanje zrelosti kukuruza. Proksimalne metode omogućuju mjerenje fluorescencije biljaka u stvarnom vremenu i na licu mjesta, što pruža detaljniji uvid u senescenciju i zrelost biljaka. Prema rezultatima studije, korištenje proksimalnih metoda mjerenja fluorescencije omogućuje lakše uočavanje senescencije u biljkama prije no što je ona vidljiva golim okom. Senescencija je proces starenja biljke koji je često povezan s postizanjem zrelosti. Zbog te povezanosti, proksimalne metode mjerenja fluorescencije su efikasne u predviđanju zrelosti kukuruza.

Veliki broj autora istraživao je povezanost nedostatka vode u vegetaciji i vlažnosti zrna u berbi s prinosom zrna (**Hamad i sur., 2020.; Zhang i sur., 2021.**). Predviđanje vlage zrna u berbi i njenog otpuštanja pri nalijevanju zrna (**Li i sur., 2020.; Ni i sur., 2022.**) predstavlja važan element u današnjem oplemenjivanju i proizvodnji kukuruza jer se u mnogim proizvodnim regijama pravi prijelaz na hibride ranijih vegetacijskih skupina koji brže otpuštaju vlagu i na taj način smanjuju troškove sušenja zrna, što je značajan trošak u proizvodnji kukuruza. Istraživanje **Zhanga i sur. (2021.)** naglašava važnost pravilnog upravljanja sušenjem zrna u kukuruznoj proizvodnji kako bi se postigla optimalna vlažnost zrna pri žetvi. Smanjenje vlažnosti zrna može smanjiti gubitke proizvodnje i omogućiti učinkovitije žetvene postupke. Zamjena kultivara s visokim potencijalom prinosa i brzom stopom sušenja zrna može poboljšati produktivnost u uvjetima žetve zrna s umjerenom vlagom. Daljnja istraživanja trebaju se fokusirati na pronalaženje načina za smanjenje vlažnosti zrna pri žetvi na još niže vrijednosti, kako bi se postigle veće prednosti u proizvodnji i sušenju zrna kukuruza. Za usporedbu, u ovome su istraživanju postignute usporedive vrijednosti predviđanja vlage, iako je metoda korištena ranije u vegetaciji.

Vrijednosti pondera u modelu za predviđanje vlage zrna u berbi s biofizičkim parametrima fluorescencije klorofila *a* pokazuju određene razlike u usporedbi s vrijednostima pondera u modelu za predviđanje prinosa zrna. Najviša vrijednost pondera postignuta je za parametar $\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$, koji predstavlja vjerojatnost da molekula klorofila u fotosustavu II funkcionira kao reakcijsko središte. Također, apsolutne vrijednosti pondera veće od 0,2 primijećene su za parametre d_{VG}/d_{To} , koji predstavlja nagib krivulje fluorescencije pri ishodištu, i RE_0/RC , koji predstavlja vjerojatnost da tok elektrona svakog reakcijskog središta reducira krajnje akceptore elektrona na strani fotosustava I. U modelu s 118 mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a* procijenjene su ukupno 52 latentne varijable. Vrijednosti RMSEP modela opadale su do 10. komponente, nakon čega je došlo do porasta vrijednosti s povećanjem broja komponenti. Uzorak vrijednosti pondera tranzijenata fluorescencije klorofila *a* u modelu za predviđanje vlage zrna bio je sličan uzorku u modelu za predviđanje prinosa zrna, s nešto nižim vrijednostima za korak P, odnosno maksimalnu fluorescenciju. Najviše apsolutne vrijednosti pondera u ovom modelu bile su oko 0,3. Ovi rezultati ukazali su na važnost određenih parametara fluorescencije klorofila *a* u predviđanju vlage zrna u berbi. Parametri poput vjerojatnosti reakcijskog središta, nagiba krivulje fluorescencije i vjerojatnosti redukcije elektronskog toka su potencijalno korisni za procjenu vlage zrna. Također, optimalni model s odabranim latentnim varijablama pokazao je dobru točnost u predviđanju ovog svojstva.

4.5. Analiza učinkovitosti indirektne selekcije

Efikasnost indirektne selekcije za prinos zrna putem biofizičkih parametara bila je niža u odnosu na efikasnost korištenjem tranzijenata fluorescencije klorofila *a*. Prema rezultatima, efikasnost indirektne selekcije korištenjem biofizičkih parametara iznosila je 38,86 % efikasnosti izravne selekcije, dok je korištenjem tranzijenata ostvarena visoka efikasnost od 92,41 % efikasnosti izravne selekcije. To znači da je korištenje tranzijenata kao prediktora prinosa zrna omogućilo preciznije i efikasnije odabiranje genotipova s visokim prinosom. Međutim, efikasnost indirektne selekcije za vlagu zrna u berbi putem biofizičkih parametara bila je relativno visoka, ostvarujući 86,89 % efikasnosti izravne selekcije za to svojstvo, dok su tranzijenti bolje predviđali okolišnu varijancu pa je

efikasnost indirektne selekcije bila 0. Ovi rezultati ukazuju na važnost i upotrebljivost biofizičkih parametara u predviđanju vlažnosti zrna i prinosa.

Mnogi autori su spekulirali o upotrebljivosti fluorescencije klorofila *a* za indirektnu selekciju kod kukuruza (**O'Neill i sur.**, 2006.; **Lepeduš i sur.**, 2012.; **Franić i sur.**, 2019.; **Wang i sur.**, 2023.), a u manjem broju radova analizirana je efikasnost indirektne selekcije (**Galić i sur.**, 2019.a). Razlog tomu je potreba za fenotipizacijom velikog broja parcelica s ciljem dobivanja pouzdanih informacija o komponentama varijance, što je većini istraživačkih institucija koje proučavaju fotobiologiju neizvedivo.

Primjerice, istraživanje koje su proveli **Ziyomo i Bernardo** (2013.) ispitalo je fenotipizaciju kukuruza radi tolerantnosti na sušu koja je skupa i vremenski zahtjevna. Indirektna selekcija temeljena na intervalu svilanja i polinacije, senescenciji lista, sadržaju klorofila lista ili prinosu zrna u kontrolnim uvjetima nije pokazala veću učinkovitost od direktne selekcije za prinos zrna pod sušom. Genomska selekcija (sa 998 markera) za prinos zrna pod sušom imala je predviđenu relativnu učinkovitost od 1,24. S obzirom na to da je u kukuruzu moguće obaviti više ciklusa selekcije temeljene na markerima godišnje, a genotipizacija je jeftinija od fenotipizacije za toleranciju na sušu, njihovi rezultati sugeriraju da bi genomsko selekcioniranje moglo povećati genetičku dobit po jedinici vremena za prinos zrna u sušnim uvjetima.

U provedenom istraživanju, gdje su umjesto markera korištena svojstva fluorescencije klorofila *a*, utvrđene su efikasnosti indirektne selekcije blizu efikasnosti izravne selekcije, što sugerira mogućnost brzog odabira poželjnih roditeljskih komponenata u periodu prije cvatnje, dok je moguće provesti križanja u polju.

5. ZAKLJUČCI

Zaključci ovoga istraživanja su sljedeći:

1. Analizom varijance za svojstvo F_v/F_m u setu ispitivanih hibrida utvrđeni su statistički značajni učinci genotipa, godine, ponavljanja i bloka, što ukazuje na postojanje genetičke varijabilnosti u svojstvima fluorescencije klorofila *a* te na utjecaj godine, ponavljanja i bloka na ovo svojstvo.
2. Korelacija između prinosa zrna i PI_{ABS} bila je pozitivna slaba do vrlo slaba, a PI_{ABS} i vlage zrna u berbi slaba do vrlo slaba negativna. Korelacija za svojstvo F_v/F_m utvrđena je samo s PI_{ABS} . Genetičke korelacije između svih svojstava bile su uglavnom vrlo slabe negativne. Umjerena negativna genetička korelacija utvrđena je između svojstava F_v/F_m i vlage zrna u berbi, a jaka između svojstava F_v/F_m i PI_{ABS} . Kod ostalih izračunatih genetičkih korelacija, greška procjene bila je niža od procenjenog iznosa korelacije samo između PI_{ABS} i vlage zrna u berbi, uz vrlo niski iznos korelacije. Varijanca objašnjena genotipom za prinos zrna bila je viša u odnosu na varijancu objašnjenu genotip-okolina interakcijom, a niža u odnosu na varijancu greške. Ostvarena je umjereno visoka heritabilnost prinosa zrna (0,64). Komponenta varijance objašnjene genotipom za vlagu zrna bila je viša u odnosu na varijancu greške, a niža u odnosu na varijancu objašnjenu genotip-okolina interakcijom. Ostvarena je umjereno visoka heritabilnost svojstva vlage zrna s niskim iznosom greške procjene. Komponenta varijance objašnjena genotipom za svojstvo F_v/F_m bila je niža u odnosu na komponentu varijance objašnjene genotip-okolina interakcijom i varijancu greške. Za svojstvo F_v/F_m ostvarena je visoka procjena heritabilnosti. Varijanca objašnjena genotipom za PI_{ABS} bila je viša u odnosu na varijancu objašnjenu interakcijom genotip-okolina, i niža u odnosu na varijancu greške što je rezultiralo visokom procjenom heritabilnosti svojstva.
3. Model s 10 latentnih varijabli ima veću prediktivnu sposobnost od ostalih modela za predviđanje prinosa zrna kukuruza. Analiza pondera u modelima ukazuje na važnost određenih parametara za predviđanje prinosa zrna. Signali indukcije fluorescencije klorofila *a*, parametri izvedeni iz krivulje tranzijenata i tokovi elektrona izraženi po poprečnom presjeku pokazali su veću značajnost u

objašnjavanju varijabilnosti prinosa zrna. Korištenje biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a*, posebno tranzijenata fluorescencije, može biti korisno u predviđanju vlažnosti zrna u berbi kukuruza. Kalibrirani model sa 118 mjerenih tranzijenata pokazao je najbolju prediktivnu sposobnost. Analiza komponenata varijance mješovitim modelom pokazala je komponente genetičke varijance različite od nule za sva predviđena svojstva, osim varijance genotip - okolina za prinos te genetičke varijance za vlagu zrna predviđenu korištenjem mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a*. Varijanca objašnjena interakcijom genotip – okolina bila je viša od varijance objašnjene genotipom kod vlage zrna predviđene korištenjem biofizičkih parametara i prinosa zrna predviđenog tranzijentima. Procijenjene su niske do umjerene vrijednosti heritabilnosti za sva predviđena svojstva osim za vlagu zrna predviđenu tranzijentima. U modelima koji su koristili biofizičke parametre, ostvarena je umjerena do niska genetička korelacija s izvornim svojstvom. Snaga genetičke korelacije vlage zrna predviđenog biofizičkim parametrima i izvornog svojstva bila je jaka do vrlo jaka. Najviša genetička korelacija s izvornim svojstvom ostvarena je kod prinosa zrna predviđenog korištenjem mjerenih tranzijenata fluorescencije klorofila *a*.

4. Efikasnost indirektne selekcije za prinos zrna korištenjem biofizičkih parametara bila je niža od efikasnosti izravne selekcije. S druge strane, efikasnost indirektne selekcije za vlagu zrna u berbi putem biofizičkih parametara bila je relativno visoka.

Rezultati ovog istraživanja naglašavaju važnost i upotrebljivost parametara fluorescencije klorofila *a* u oplemenjivačkim programima kukuruza.

6. LITERATURA

1. Ahmad, I., Ahmad, S., Kamran, M., Yang, X.N., Hou, F.J., Yang, B.P., Ding, R.X., Liu, T., Han, Q.F. (2021). Uniconazole and nitrogen fertilization trigger photosynthesis and chlorophyll fluorescence, and delay leaf senescence in maize at a high population density. *Photosynthetica* 59:192-202.
2. Andorf, C.M., Beavis, W.D., Hufford, M., Smith, S., Suza, W.P., Wang, K., Woodhouse, M.R., Yu, J., Lübberstedt, T. (2019). Technological advances in maize breeding: past, present and future. *Theoretical and Applied Genetics* 132(3):817-849.
3. Araus, J.L., Serret, A.D., Edmeades, G.O. (2012). Phenotyping maize for adaptation to drought. *Front Physiol* 3: 305. doi: 10.3389/fphys.2012.00305
4. Araus, J.L., Cairns, J.E. (2014): Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science* January 2014, Vol. 19, No. 1.
5. Araus, J.L., Kefauver, S. C., Zaman-Allah, M., Olsen, M.S., Cairns, J.E. (2018). Translating high-throughput phenotyping into genetic gain, *Trends in Plant Science* 23(5):451-466,
6. Assefa, Y., Carter, P., Hinds, M., Bhalla, G., Schon, R., Jeschke, M., Paszkiewicz, S. et al. (2018): Analysis of Long Term Study Indicates Both Agronomic Optimal Plant Density and Increase Maize Yield per Plant Contributed to Yield Gain. *Scientific Reports*.
7. Assefa, Y., Prasad, P.V.V., Carter, P., Hinds, M., Bhalla, G., Schon, R., Jeschke, M. et al. (2017): A new insight into corn yield: Trends from 1987 through 2015. *Crop Science* 57: 2799-2811.
8. Badr, A., Brüggemann, W. (2020). Special issue in honour of Prof. Reto J. Strasser – Comparative analysis of drought stress response of maize genotypes using chlorophyll fluorescence measurements and leaf relative water content. *Photosynthetica* 58:638-45.
9. Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89–113. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759
10. Bänziger, M., Lafitte, H.R. (1997). Efficiency of secondary traits for improving maize for low-nitrogen target environments. *Crop Science* 37:1110-1117.
11. Bänziger, M., G.O. Edmeades, D. Beck, and M. Bellon. 2000. Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: From Theory to Practice. Mexico, D.F.: CIMMYT.
12. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S. (2014): Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. 67: .
13. Bernardo, R. (2010): Breeding for Quantitative Traits in Plants. 2.a ed. Stemma Press, Woodbury, MN.

14. Betrán, F.J., Beck, D., Bänziger, M., Edmeades, G.O. (2003): Genetic analysis of inbred and hybrid grain yield under stress and nonstress environments in tropical maize. *Crop Science*.
15. Bolaños, J., Edmeades G.O. (1996). The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res.* 48:65–80. doi:10.1016/0378-4290(96)00036-6.
16. Brestic, M., Zivcak, M. (2013). PSII fluorescence for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: Rout G.R. and Das A.B. (eds.) *Molecular stress physiology of plants*. Springer 2013, pp. 87-131.
17. Bruce, W.B., Edmeades, G.O., Barker, T.C. (2002). Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:13–25. doi:10.1093/jexbot/53.366.13
18. Bussotti, F., Gerosa, G., Digrado, A., Pollastrini, M. (2020). Selection of chlorophyll fluorescence parameters as indicators of photosynthetic efficiency in large scale plant ecological studies, *Ecological Indicators*, Volume 108, 2020, 105686, ISSN 1470-160X, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105686>.
19. Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Mare, C. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.* 105:1–14.
20. Chapman, S.C., Edmeades, G.O. (1999): Selection improves drought tolerance in tropical maize populations: II. Direct and correlated responses among secondary traits. *Crop Science*.
21. Chen, X., Mo, X., Zhang, Y., Sun, Z., Liu, Y., Hu, S., Liu, S. (2019). Drought detection and assessment with solar-induced chlorophyll fluorescence in summer maize growth period over North China Plain, *Ecological Indicators*, 104:347-356, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.05.017>.
22. Ci, X., Li, M., Liang, X., Xie, Z., Zhang, D., Li, X., Lu, Z., Ru, G., Bai, L., Xie, C., Hao, Z., Zhang, S. (2011): Genetic contribution to advanced yield for maize hybrids released from 1970 to 2000 in China. *Crop Science* 51(1):13-20.
23. Covarrubias-Pazaran, G. (2016): Genome-assisted prediction of quantitative traits using the *r* package sommer. *PLoS ONE* 11: 1-15.
24. Državni zavod za statistiku (2018). Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2018. <https://podaci.dzs.hr/media/wsdkedwa/sljh2018.pdf>.
25. Duvick, D.N. (1999). Heterosis: feeding people and protecting resources. In: Coorsand, J.G., Pandey, S. (eds.) *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. (Madison,WI:American Society of Agronomy - Crop Science Societyof America - Soil

- Society of America), 19–29.
26. Duvick, D.N. (2005): The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). *Advances in Agronomy*, Volume 86.
 27. Edmeades, G.O., Bolaños, J., Chapman, S.C. (1996). Value of secondary traits in selecting for drought tolerance in tropical maize. In: Edmeades G.O., Bänziger, M., Mickelson, H.R., Peña-Valdivia, C.B. (eds.) *Developing drought- and low N-tolerant maize. Proceedings of a Symposium*, March 25-29, 1996, CIMMYT, El Batán, Mexico.
 28. Edmeades, G.O., Bolaños, J., Bänziger, M., Ribaut, J.-M., White, J.W., Reynolds, M.P., Lafitte, H.R. (1998). Improving crop yields under water deficits in the tropics. p. 437–451. In V.L. Chopra et al. (ed.). *Crop productivity and sustainability - shaping the future. Proc. Int. Crop Sci. Congress*, 2nd, New Delhi. 10–17 Nov. 1996. Oxford and IBH, New Delhi.
 29. Ertiro, B.T., Olsen, M., Das, B., Gowda, M., Labuschagne, M. (2020). Efficiency of indirect selection for grain yield in maize (*Zea mays* L.) under low nitrogen conditions through secondary traits under low nitrogen and grain yield under optimum conditions. *Euphytica* (2020) 216:134.
 30. Fahad, S., Bajwa, A.A., Nazir, U., Anjum, S.A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M.Z., Alharby, H., Wu, C., Wang, D., Huang, J. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science* 8:1147.
 31. Falkowski, P.G., Wyman, K., Ley, A.C., Mauzerall, D. (1986). Relationship of steady state photosynthesis to fluorescence in eucaryotic algae. *Biochim Biophys Acta* 849:183–192.
 32. FAOSTAT (2023). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
 33. Fellahi, Z.E., Hannachi, A., Bouzerzour, H. (2018). Analysis of direct and indirect selection and indices in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) segregating progeny. *International Journal of Agronomy*, Volume 2018, Article ID 8312857, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/8312857>
 34. Fracheboud, Y., Haldimann, P., Leipner, J., Stamp, P. (1999). Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, Vol. 50, No. 338, pp. 1533–1540.
 35. Fracheboud, Y., Leipner, J. (2003). The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. In: DeEll, J.R., Toivonen, P.M.A. (eds.) *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0415-3_4
 36. Franić, M., Mazur, M., Volenik, M., Brkić, J., Brkić, A., Šimić, D. (2015). Effect of plant density on agronomic traits and photosynthetic traits and photosynthetic performance in the maize IBM population. *Poljoprivreda* 21(2):36-40.

-
37. Franić, M., Galić, V., Mazur, M., Šimić, D. (2017). Effects of excess cadmium in soil on JIP-test parameters, hydrogen peroxide content and antioxidant activity in two maize inbreds and their hybrid. *Photosynthetica* 56: 660-669.
 38. Franić, M., Jambrović, A., Zdunić, Z., Šimić, D., Galić, V. (2019). Photosynthetic properties of maize hybrids under different environmental conditions probed by the chlorophyll a fluorescence. *Maydica* 64(3):M25.
 39. Franić, M., Galić, V., Lončarić, Z., Šimić, D. (2020). Genotypic variability of photosynthetic parameters in maize ear-leaves at different cadmium levels in soil. *Agronomy* 10(7):986.
 40. Galic, V, Franic, M, Jambrovic, A, Ledencan, T, Brkic, A, Zdunic, Z, Simic, D. (2019a). Genetic correlations between photosynthetic and yield performance in maize are different under two heat scenarios during flowering. *Front Plant Sci* 10: 566.
 41. Galić, V., Mazur, M., Brkić, A., Volenik, M., Jambrović, A., Zdunić, Z., Šimić, D. (2019b). Factors affecting the accuracy of genomic predictions in testcrosses of maize biparental population. *Poljoprivreda* 25:2019 (2) 10-16.
 42. Galić, V., Mazur, M., Šimić, D., Zdunić, Z., Franić, M. (2020). Plant biomass in salt-stressed young maize plants can be modelled with photosynthetic performance. *Photosynthetica* 58:194-204.
 43. Gallais, A., Coque, M., Bertin, P. (2008). Response to selection of maize population for adaptation to high or low nitrogen fertilization. *Maydica* 53:21–28.
 44. Gao, F., Wang, G. Y., Muhammad, I., Tung, S. A., & Zhou, X. B. (2022). Interactive effect of water and nitrogen fertilization improve chlorophyll fluorescence and yield of maize. *Agronomy Journal* 115:325-339.
 45. Ghannoum, O. (2009). C4 photosynthesis and water stress. *Ann Bot* 103(4):635-44.
 46. Gheith, E.M.S., El-Badry, O.Z., Lamloom, S.F., Ali, H.M., Siddiqui, M.H., Ghareeb, R.Y., El-Sheikh, M.H., Jebril, J., Abdelsalam, N.R., Kandil, E.E. (2022) Maize (*Zea mays* L.) productivity and nitrogen use efficiency in response to nitrogen application levels and time. *Frontiers in Plant Science* 13:941343.
 47. Goltsev, V.N., Kalaji, H.M., Paunov, M., Bąba, W., Horaczek, T., Mojski, J., Kociel, H., Allakhverdiev, S.I. (2016). Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russ J Plant Physiol* 63, 869–893.
 48. Gonzalo, M, Holland, J.B., Vyn, T.J., McIntyre, L.M. (2010). Direct mapping of density response in a population of B73 x Mo17 recombinant inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Heredity* 104(6):583-599.
 49. Guidi, L., Lo Piccolo, E., Landi, M. (2019). Chlorophyll fluorescence, photoinhibition and
-

- abiotic stress: does it make any difference the fact to be a C3 or C4 species? *Frontiers in Plant Science*, Volume 10, Article 174.
50. Guidi, L., and Calatayud, A. (2014). Non-invasive tools to estimate stress-induced changes in photosynthetic performance in plants inhabiting Mediterranean areas. *Environ. Exp. Bot.* 103, 42–52. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.12.007
 51. Guo, Y., and Tan, J. (2015). Recent advances in the application of chlorophyll a fluorescence from Photosystem II. *Photochem. Photobiol.* 91, 1–14. doi: 10.1111/php.12362
 52. Gururani, M. A., Venkatesh, J., and Tran, L. S. P. (2015). Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol. Plant* 8, 1304–1320. doi: 10.1016/j.molp.2015.05.005
 53. Haegele, J.W., Cook, K.A., Nichols, D.M., Below, F.E. (2013.): Changes in nitrogen use traits associated with genetic improvement for grain yield of maize hybrids released in different decades. *Crop Science* 53(4):1256-1268.
 54. Hallauer, A.R., Carena, M.J., Filho, J.B.M. (2010): *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Springer New York, NY.
 55. Hammad, H.M., Abbas, F., Ahmad, A., Bakhat, H.F., Farhad, W., Wilkerson, C.J., Fahad, S., Hoogenboom, G. (2020). Predicting Kernel Growth of Maize under Controlled Water and Nitrogen Applications. *Int. J. Plant Prod.* 14:609-620.
 56. Harrison, M.T., Tardieu, F., Dong, Z., Messina, C.D., Hammer, G.L. (2014). Characterizing drought stress and trait influence on maize yield under current and future conditions. *Glob Change Biol* 2014, 20, 867-878.
 57. Hu, S., Ding, Y., Zhu, C. (2020). Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Frontiers in Plant Science* 11:375.
 58. Jung, C., Müller, A. (2009). Flowering time control and applications in plant breeding. *trends in Plant Science* 14(10):563-573.
 59. Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, N., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L., et al. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth. Res.* 132, 13–66. doi: 10.1007/s11120-016-0318-y
 60. Kalaji, H. M., Schansker, G., Ladle, R. J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S. I., et al. (2014). Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth. Res.* 122, 121–158. doi: 10.1007/s11120-014-0024-6.
 61. Kamphorst, S.H., Teixeira do Amaral Júnior, A., Jário de Lima, V., Araújo Diniz Santos, P.H., Pereira Rodrigues, W., Silva Vivas, J.M., Gonçalves, G.M.B., Medeiros Schmitt, K.F., Torres Leite, J., Vivas, M., Mora-Poblete, F., Vergara-Díaz, O., Araus Ortega, J.L., Cochicho Ramalho, J., Campostrini, E. (2020). Comparison of selection traits for effective

- popcorn (*Zea mays* L. var. *Everta*) breeding under water limiting conditions. *Frontiers in Plant Science*, August 2020, Volume 11, Article 1289.
62. Kitajima, M., and Butler, W. L. (1975). Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 105–115. doi: 10.1016/0005-2728(75)90209-1.
 63. Kolber, Z.S., Prašil, O., Falkowski, P.G. (1998). Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochim Biophys Acta* 1367:88–110.
 64. Krause, G. H. (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plantarum* 74, 566–574. doi:10.1111/j.1399-3054.1988.tb02020.x
 65. Krause, G. H., and Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313–349. doi: 10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
 66. Lafitte, R., Blum, A., Atlin, G. (2003). Using secondary traits to help identify drought tolerant genotypes. In: K.S. Fischer, R. Lafitte, S. Fukai, G. Atlin, and B. Hardy, editors, *Breeding rice for drought-prone environments*. IRRI, Los Baños, Philippines. p. 37–48.
 67. Lee, E.A., Tracy, W.F. (2009). Modern Maize Breeding. In: Bennetzen, J.L., Hake, S. (eds) *Handbook of Maize*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77863-1_7.
 68. Lee, M., Sharopova, N., Beavis, W.D., Grant, D., Katt, M., Blair, D., Hallauer, A. (2002). Expanding the genetic map of maize with the intermated B73 x Mo17 (IBM) population. *Plant Mol Biol.* 2002 Mar-Apr;48(5-6):453-61.
 69. Lepeduš, H., Brkić, I., Cesar, V., Jurković, V., Antunović, J., Jambrović, A., Brkić, J., Šimić, D. (2012). Chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Periodicum Biologorum* 114: 73-76.
 70. Li, L., Ming, B., Gao, S., Wang, K., Hou, P., Jin, X., Chu, Z., Zhang, W., Huang, Z., Li, H., Zhou, X., Bai, S., Zhang, Z., Xie, R., Li, S. (2020). A regional analysis model of maize kernel moisture. *Agronomy Journal* 113(2):1467-1479.
 71. Li, K., Pan, J., Xiong, W., Xie, W., Ali, T. (2022). The impact of 1.5 °C and 2.0 °C global warming on global maize production and trade. *Scientific Reports* 12, 17268 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22228-7>.
 72. Lobell, D.B., Roberts, M.J., Schlenker, W., Braun, N., Little, B.B., Rejesus, R.M., Hammer, G.L. (2014). Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the U.S. Midwest. *Science* 2;344(6183):516-9..

73. Malenica, N., Antunović Dunić, J., Vukadinović, L., Cesar, V., Šimić, D. (2021). Genetic approaches to enhance multiple stress tolerance in maize. *Genes* 2021, 12, 1760.
74. Malnoš, M. (2018). Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environ. Exp. Bot.* 154, 123–133. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.05.005
75. Marchiori, P.E.R., Machado, E.C., Ribeiro, R.V. (2014). Photosynthetic limitations imposed by self-shading in field-grown sugarcane varieties. *Field Crops Research* 155:30-37.
76. Mauzerall, D. (1972). Light-induced changes in *Chlorella*, and the primary photoreaction for the production of oxygen. *Proc Natl Acad Sci* 69:1358–1362
77. Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. doi: 10.1093/jexbot/51.345.659
78. McMillan, I., Fairfull, R.W., Quinton, M., Friars, G.W. (1995). The effect of simultaneous selection on the genetic correlation. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 776-779.
79. Messmer, R., Fracheboud, Y., Bänziger, M., Vargas, M., Stamp, P., Ribaut, J.M. (2009.): Drought stress and tropical maize: QTL-by-environment interactions and stability of QTLs across environments for yield components and secondary traits. *Theoretical and Applied Genetics*.
80. Mevik, B.H., Wehrens, R. (2007.): The pls package: Principal component and partial least squares regression in R. *Journal of Statistical Software*.
81. Monneveux, P., Sanchez, C., Tiessen, A. (2008): Future progress in drought tolerance in maize needs new secondary traits and cross combinations. *Journal of Agricultural Science* 146:287-300.
82. Murchie, E. H., and Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide
83. to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* 64, 3983–3998. doi: 10.1093/jxb/ert208
84. Nannas, N.J., Dawe, R.K. (2015). Genetic and genomic toolbox of *Zea mays*. *Genetics* 199:655-669.
85. Nascimento-Júnior I., Môro G.V., Môro F.V. (2018). Indirect selection of maize genotypes based on associations between root agronomic and anatomical characters. *Chilean Journal of Agricultural Research* 78(1) January-March 2018.
86. Ni, P., Anche, M.T., Ruan, Y., Dang, D., Morales, N., Li, L., Liu, M., Wang, S., Robbins, K.R. (2022). Genomic prediction strategies for dry-down-related traits in maize. *Front. Plant Sci.* 13:930429. doi: 10.3389/fpls.2022.930429
87. Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., and Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys.*

- Acta 1757, 742–749. doi: 10.1016/j.bbabbio.2006.05.013
88. O'Neill, P.M., Shanahan, J.F., Schepers, J.S. (2006). Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Science*. 46:681–687.
 89. Olson, R.J., Chekalyuk, A.M., Sosik, H.M. (1996). Phytoplankton photosynthetic characteristics from fluorescence induction assays of individual cells. *Limnol Oceanogr* 41:1253–1263.
 90. Öquist, G., Chow, W. S., and Anderson, J. M. (1992). Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta* 186, 450–460. doi: 10.1007/BF00195327
 91. Park, Y., Chow, W. S., Osmond, C. B., and Anderson, J. M. (1996). Electron transport to oxygen mitigates against the photoinactivation of Photosystem II in vivo. *Photosynth. Res.* 50, 23–32. doi: 10.1007/BF00018218
 92. R Core Team. (2018.): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
 93. Ribaut, J.-M., Betran, J., Monneveux, P., Setter, T. (2009). Drought tolerance in maize. In: Bennetzen, J.L., Hake, S.C. (eds.) *Handbook of maize: Its biology*. Springer, New York, NY, USA, pp 311-344.
 94. Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol.* 170, 1903–1916. doi: 10.1104/pp.15.01935
 95. Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F., Pasternak S., Liang C., Zhang J., Fulton L., Graves T.A., Minx P., Reily A.D., Courtney L., Kruchowski S.S., Tomlinson C., Strong C., Delehaunty K., Fronick C., Courtney B., Rock S.M., Belter E., Du F., Kim K., Abbott R.M., Cotton M., Levy A., Marchetto P., Ochoa K., Jackson, S.M., Gillam B., Chen W., Yan L., Higginbotham J., Cardenas M., Waligorski J., Applebaum E., Phelps L., Falcone J., Kanchi K., Thane T., Scimone A., Thane N., Henke J., Wang T., Ruppert J., Shah N., Rotter K., Hodges J., Ingenthron E., Cordes M., Kohlberg S., Sgro J., Delgado B., Mead K., Chinwalla A., Leonard S., Crouse K., Collura K., Kudrna D., Currie J., He R., Angelova A., Rajasekar S., Mueller T., Lomeli R., Scara G., Ko A., Delaney K., Wissotski M., Lopez G., Campos D., Braidotti M., Ashley E., Golser W., Kim H., Lee S., Lin J., Dujmic Z., Kim W., Talag J., Zuccolo A., Fan C., Sebastian A., Kramer M., Spiegel L., Nascimento L., Zutavern T., Miller B., Ambroise C., Muller S., Spooner W., Narechania A., Ren L., Wei S., Kumari S., Faga B., Levy M.J., McMahan L., Van Buren P., Vaughn M.W., Ying K., Yeh C., Emrich S.J., Jia Y., Kalyanaraman A., Hsia A., Barbazuk W.B., Baucom R.S., Brutnell T.P., Carpita N.C., Chaparro C., Chia J., Deragon J., Estill J.C., Fu

- Y., Jeddeloh J.A., Han Y., Lee H., Li P., Lisch D.R., Liu S., Liu Z., Holligan Nagel D., McCann M.C., SanMiguel P., Myers A.M., Nettleton D., Nguyen J., Penning B.W., Ponnala L., Schneider K.L., Schwartz D.C., Sharma A., Soderlund C., Springer N.M., Sun Q., Wang H., Waterman M., Westerman R., Wolfgruber T.K., Yang L., Yu Y., Zhang L., Zhou S., Zhu Q., Bennetzen J.L., Kelly Dawe R., Jiang J., Jiang N., Presting G.G., Wessler S.R., Aluru S., Martienssen R.A., Clifton S.W., McCombie W.R., Wing R.A., Wilson R.K. (2009). The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: 1112-1115.
96. Schreiber, U., Schliwa. U., Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10:51–62
 97. Schreiber U (2004) Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration*, vol 19. Springer, Dordrecht.
 98. Spišić J., Šimić D., Balen J., Jambrović A., Galić V. (2022). Machine learning in the analysis of multispectral reads in maize canopies responding to increased temperatures and water deficit. *Remote Sensing*. 2022; 14(11):2596. <https://doi.org/10.3390/rs14112596>
 99. Spyroglou, I., Rybka, K., Maldonado Rodriguez, R., Stefański, P., Valasevich, N.M. (2021). Quantitative estimation of water status in field-grown wheat using beta mixed regression modeling based on fast chlorophyll fluorescence transients. A method for drought tolerance estimation. *J Agro Crop Sci*. 207:589-605.
 100. Stirbet, A., Lazár, D., Kromdijk, J., and Govindjee, G. (2018). Chlorophyll a fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica* 56, 86–104. doi: 10.1007/s11099-018-0770-3
 101. Strasser, R.J., Govindjee (1991) The Fo and the OJIP fluorescence rise in higher plants and algae. In: Argyroudi-Akoyunoglou JH (ed) *Regulation of chloroplast biogenesis*. Plenum Press, New York.
 102. Strasser RJ, Govindjee (1992) On the OJIP fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Murata N (ed) *Research in photosynthesis*, vol II. Kluwer Academic, Dordrecht.
 103. Strasser, R.J., Srivastava, A., Govindjee. (1995): Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 61(1):32-42.
 104. Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2000): The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty (eds.) *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adaptation*. CRC

-
- Press, Taylor & Francis Group.
105. Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2004): Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In: G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds.) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer.
 106. Šimić, D., Lepeduš, H., Jurković, V., Antunović, J., Cesar, V. (2014). Quantitative genetic analysis of chlorophyll a fluorescence parameters in maize in the field environments. *J Integr Plant Biol* 56: 695-708.
 107. Tembo, L., Asea, G., Gibson, P.T., Okori, P. (2016). Indirect selection for resistance to *Stenocarpella maydis* and *Fusarium graminearum* and the prospects of selecting for high-yielding and resistant maize hybrids. *Plant Breeding*, 135, 446–451 (2016)
 108. Tikkanen, M., and Grebe, S. (2018). Switching off photoprotection of photosystem
 109. I – a novel tool for gradual PSI photoinhibition. *Physiol. Plant* 162, 156–161.
 110. doi: 10.1111/ppl.12618
 111. Tollenaar, M., Wu, J. (1999). Yield improvement in temperate maize is attributable to greater stress tolerance. *Crop Science* 39(6):1597-1604.
 112. Tollenaar, M., Lee, E.A. (2006). Dissection of physiological processes underlying grain yield in maize by examining genetic improvement and heterosis. *Maydica* 51:399-408.
 113. Tollenaar, M., Ying, J., Duvick, D.N. (2000). Genetic gain in corn hybrids from the Northern and Central Corn Belt. In: *Proceedings of the 55th Corn and Sorghum Research Conference* (Washington, DC: American Seed Trade Association), 53–62.
 114. Troyer, A.F. (1996): Breeding widely adapted, popular maize hybrids. *Euphytica* 92:163–174
 115. Troyer, A.F. (1999): Background of U.S. Hybrid Corn. *Crop Science* 39:601-626.
 116. Troyer, A.F. (2000). Temperate corn - background, behavior and breeding. In: Hallauer, A. (ed). *Specialty corns*, 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, 2000.
 117. Troyer, A.F. (2009). Development of hybrid corn and the seed corn industry. In: Bennetzen J.L., Hake S.C. (eds.) *Handbook of maize: Genetics and genomics*, pp. 87-114. Springer, New York, NY.
 118. van Eeuwijk, F.A., Bustos-Korts, D.V., Malosetti, M. (2016). What should students in plant breeding know about the statistical aspects of genotype $\times$ environment interactions? *Crop Science* 56:2119-2140.
 119. Wang, T., Ma, X., Li, Y., Bai, D., Liu, C., Liu, Z., Tan, X., Shi, Y., Song, Y., Carlone, M., Bubeck, D., Bhardwaj, H., Jones, E., Wright, K., Smith, S. (2011): Changes in yield and yield components of single-cross maize hybrids released in China between 1964 and 2001. *Crop Science* 51(2):512-525.
 120. Wang, X., Zhu, Y., Yan, Y., Hou, J., Wang, H., Luo, N., Wei, D., Meng, Q., Wang, P.
-

- (2023). Mitigating heat impacts on photosynthesis by irrigation during grain filling in the maize field. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023, ISSN 2095-3119.
121. Wang, Y., Leng, P., Shang, G., Zhang, X., Li, Z. (2023). Sun-induced chlorophyll fluorescence is superior to satellite vegetation indices for predicting summer maize yield under drought conditions, *Computers and Electronics in Agriculture* 205, 2023, 107615, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2023.107615>.
 122. Wold, S., Ruhe, A., Wold, H., Dunn, III, W.J. (1984). The Collinearity Problem in Linear Regression. The Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses. *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing*.
 123. Waqas, M.A., Wang, X., Zafar, S.A., Noor, M.A., Hussain, H.A., Nawaz, M.A., Farooq, M. (2021). Thermal stresses in maize: effects and management strategies. *Plants (Basel)*. 2021 Feb; 10(2): 293.
 124. Xiao, Y., Jiang, S., Cheng, Q., Wang, X., Yan, J., Zhang, R., Qiao, F., Ma, C., Luo, J., Li, W., Liu, H., Yang, W., Song, W., Meng, Y., Warburton, M.L., Zhao, J., Wang, X., Yan, J. (2021). The genetic mechanism of heterosis utilization in maize improvement. *Genome Biology* 22: 148 (2021).
 125. Yi, Q., Álvarez-Iglesias, L., Malvar, R.A., Romy, M.C., Revilla, P. (2021). A worldwide maize panel revealed new genetic variation for cold tolerance. *Theoretical and Applied Genetics* 134: 1083-1094.
 126. Yu, S., Zhang, N., Kaiser, E., Li, G., An, D., Sun, Q., Chen, W., Liu, W., Luo, W. (2021). Integrating chlorophyll fluorescence parameters into a crop model improves growth prediction under severe drought', *Agricultural and Forest Meteorology* 303, 108367.
 127. Zaidi, P.H., Maniselvan, P., Sultana, R., Yadav, M., Singh R.P., Singh, S.B., Dass, S., Srinivasan, G. (2007). Importance of secondary traits in improvement of maize (*Zea mays* L.) for enhancing tolerance to excessive soil moisture stress. *Cereal Research Communications* Vol. 35, No. 3 (September 2007), pp. 1427-1435.
 128. Zhang, Z., Ming, B., Liang, H., Huang, Z., Wang, K., Yang, X., Wang, Z., Xie, R., Hou, P., Zhao, R., Li, S. (2021). Evaluation of maize varieties for mechanical grain harvesting in mid-latitude region, China. *Agronomy Journal*. 2021; 113: 1766– 1775.
 129. Zheng, H., Wang, J., Cui, Y., Guan, Z., Yang, L., Tang, Q., Sun, Y., Yang, H., Wen, X., Mei, N., Chen, X., Gu, Y. (2022). Effects of row spacing and planting pattern on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and related enzyme activities of maize ear leaf in maize–soybean intercropping. *Agronomy* 12(10):2503.
 130. Ziyomo, C., Bernardo, R. (2013): Drought tolerance in maize: Indirect selection through secondary traits versus genomewide selection. *Crop Science* 53: 1269-1275.

7. SAŽETAK

Kukuruz je uz rižu i pšenicu jedna od najvažnijih žitarica i jedna od najvažnijih kulturnih biljaka na svijetu. Većina proizvedenog kukuruza u svijetu danas su hibridi dobiveni klasičnim i novijim metodama oplemenjivanja bilja. Cilj oplemenjivačkih programa je maksimizacija genetičke dobiti po jedinici vremena, stoga je u modernim oplemenjivačkim programima važno pronaći sekundarna svojstva koja su u korelaciji s prinosom i imaju visoku heritabilnost, što omogućuje indirektnu selekciju za svojstva od interesa. Često korištena sekundarna svojstva u selekciji kukuruza za prinos zrna su interval između polinacije i svilanja (ASI), broj klipova po biljci te svojstva metlice. Pristup indirektnoj selekciji statističkim modeliranjem korištenjem senzorskih, fiziološki relevantnih podataka predstavlja novi izazov modernog oplemenjivanja bilja. Fotosinteza je jedan od najvažnijih procesa u biljnom svijetu, ali i prirodi uopće. Proučavanje fotosintetskih mehanizama vrlo je važan pravac istraživanja kako bi se postiglo što bolje razumijevanje o utjecaju nepovoljnih vanjskih uvjeta na proizvodnju kukuruza. Analiza fluorescencije klorofila jedna je od najkorištenijih tehnika za proučavanje utjecaja stresa na fotosintezu. Primjena fluorescencije klorofila značajno je poboljšana u zadnja dva desetljeća, a formirani su i mnogi drugi informativni parametri za određivanje učinkovitosti PSII i raspodjele svjetlosne energije alternativnim mehanizmima. U ovome radu utvrđivala se genetička varijabilnost u svojstvima fluorescencije klorofila *a*, genetičke korelacije između svojstava fluorescencije klorofila *a* i agronomskih svojstava te strukturu varijance kod 16 hibrida kukuruza. Dodatni ciljevi bili su izraditi regresijski model sa svojstvima fluorescencije klorofila *a* kao prediktorima i agronomskim svojstvima kao zavisnim varijablama, istražiti strukturu varijance i heritabilnosti predviđanja te procijeniti učinkovitost indirektno selekcije u odnosu na izravnu selekciju. Analiza varijance pokazala je statistički značajne učinke genotipa, godine, ponavljanja i bloka za svojstvo Fv/Fm. Utvrđene su značajne razlike u Fv/Fm vrijednostima između ispitivanih hibrida kukuruza. Model s 10 latentnih varijabli ima veću prediktivnu sposobnost za predviđanje prinosa od ostalih modela. Korištenje tranzijenata fluorescencije može biti korisno u predviđanju vlažnosti zrna u berbi. Učinkovitost indirektno selekcije za prinos zrna bila je niža nego kod izravne selekcije, dok je učinkovitost indirektno selekcije za vlagu zrna bila relativno visoka.

Rezultati ovoga istraživanja naglašavaju važnost i upotrebljivost parametara fluorescencije klorofila *a* u oplemenjivačkim programima kukuruza.

8. SUMMARY

Use of chlorophyll *a* fluorescence in indirect selection for agronomic characteristics of maize

Along with rice and wheat, maize is one of the most important cereals and one of the most important crops in the world. Most of the maize produced in the world today are hybrids developed by classical and modern methods of plant breeding. The goal of breeding programs is to maximize genetic gain per unit of time, therefore in modern breeding programs it is important to find secondary traits that are correlated with yield and have high heritability, which enables indirect selection for traits of interest. Frequently used secondary traits in maize selection for grain yield are the interval between pollination and silking (ASI), number of ears per plant, and tassel traits. The approach to indirect selection by statistical modeling using sensors and physiological data represents a new challenge of modern plant breeding. Photosynthesis is one of the most important processes in plants, and in nature in general. The study of photosynthetic mechanisms is a very important line of research in order to achieve a better understanding of the impact of unfavorable external conditions on maize production. Chlorophyll fluorescence analysis is one of the most used techniques for studying the effects of stress on photosynthesis. The application of chlorophyll fluorescence has significantly improved in the last two decades. Many different informative parameters have been developed to determine the efficiency of PSII and the distribution of light energy by alternative mechanisms. In this study, genetic variability in chlorophyll *a* fluorescence parameters, genetic correlations between chlorophyll *a* fluorescence parameters and agronomic properties, and variance structure in 16 corn hybrids were determined. Additional goals were to develop a regression model with chlorophyll *a* fluorescence parameters as predictors and agronomic traits as dependent variables, to investigate the structure of variance and heritability of predictions, and to evaluate the effectiveness of indirect selection in relation to direct selection. Analysis of variance showed statistically significant effects of genotype, year, replication and block for the trait Fv/Fm. Significant differences in Fv/Fm values were found between the evaluated maize hybrids. The model with 10 latent variables has a higher predictive ability for yield prediction compared to other models. The use of fluorescence transients can be useful in predicting grain moisture at harvest. The efficiency of indirect selection for grain yield was

lower than that of direct selection, while the efficiency of indirect selection for grain moisture was relatively high. The results of this research emphasize the importance and applicability of chlorophyll *a* fluorescence parameters in maize breeding programs.

9. PRILOG

Prilog 1. Formule i definicije najvažnijih biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a* prema **Strasser i sur. (2004.)**

Kratice i formule JIP-test parametara	Definicije JIP-test parametara
Tranzijenti	
$F_{0.00001s} \dots F_{1s}$	Tranzijent u jednoj od 118 vremenskih točaka mjerenja porasta fluorescencije
JIP-test parametri izračunati iz tranzijenata	
$F_0 \cong F_{50\mu s}$ ili $\cong F_{20\mu s}$	Fluorescencija kada su svi PSII reakcijski centri otvoreni (približno minimalna pouzdana zabilježena fluorescencija)
$T_{FM} = t_{FMAX}$, t za F_M	Vrijeme (u ms) potrebno da se postigne maksimalna fluorescencija F_m
$F_M (= F_P)$	Maksimalna fluorescencija kada su svi PSII reakcijski centri zatvoreni (F_P kada je intenzitet aktivne svjetlosti iznad 500 $\mu\text{mol}(\text{foton}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i pod uvjetom da su svi centri aktivni kao QA-reducirajući)
$F_V \equiv F_M - F_0$	Maksimalna varijabilna fluorescencija
$S_M \equiv \text{Area} / (F_M - F_0) = \text{Area} / F_V$	Normalizirana površina u odnosu na F_m
$N = S_M \times (M_0 / V_J)$	Broj preokreta (izražava koliko puta se QA reducira u vremenskom intervalu od 0 do t_{FM})
$V_J = (F_J - F_0) / (F_M - F_0)$	Relativna varijabilna fluorescencija pri $t = 2 \text{ ms}$
$V_I = (F_I - F_0) / (F_M - F_0)$	Relativna varijabilna fluorescencija pri $t = 30 \text{ ms}$
Biofizički parametri dobiveni iz osnovnih parametara	
$kN = (ABS) \times kF \times (1 / F_M)$	Nefotokemijska konstanta deekscitacije (ABS: apsorpcijski tok - vidi dolje; kF : konstanta brzine za emisiju fluorescencije)
$kP = (ABS) \times kF \times (1 / F_0 - 1 / F_M) = kN \times (F_V / F_0)$	Fotokemijska konstanta deekscitacije
Specifični energetski tokovi (po RC: QA-reducirajući PSII reakcijski centar), u ms^{-1}	
$ABS/RC = M_0 \times (1 / V_J) \times (1 / \phi P_0)$	Apsorpcijski tok (stimulira molekule Chl <i>a</i> PSII antene) po RC (također se koristi kao bezdimenzionalna mjera približne veličine

	PSII antene)
$TRO/RC = MO \times (1 / VJ)$	Zarobljeni energetska tok (dovodi do QA redukcije) po RC
$ETO/RC = MO \times (1 / VJ) \times (1 - VJ)$	Tok prijenosa elektrona (dalje od QA ⁻) po RC
$DIO/RC = ABS/RC - TRo/RC$	Energetski tok koji se gubi po RC (pri t = 0)
Fenomenološki energetska tokovi (po CS: QA-reducirajući PSII presjek), u ms⁻¹	
$TRO/CSM = (F_V / F_M) (ABS/CSM)$	Zarobljeni energetska tok (dovodi do QA redukcije) po RC
$ETO/CSM = (F_V / F_M) (1 - V_J) (ABS/CSM)$	Tok prijenosa elektrona (dalje od QA ⁻) po RC
$DIO/CSM = (ABS/CSO) - (TRO/CSm)$	Ukupna disipirana energija po reakcijskom centru (RC)
$ABS/CSM \approx F_o$	Apsorbirani tok fotona po stimuliranom PSII presjeku u vremenu nula
Kvantni prinosi i učinkovitosti	
$\phi Po \equiv TR_0 / ABS = [1 - (F_o / F_M)]$	Maksimalni kvantni prinos za primarnu foto-kemiju
$\phi Eo \equiv ET_0 / ABS = [1 - (F_o / F_M)] \times (1 - V_J)$	Kvantni prinos za prijenos elektrona (ET)
$\psi Eo \equiv ET_0 / TR_0 = (1 - V_J)$	Učinkovitost / vjerojatnost da se elektron kreće dalje od QA ⁻
$\phi Do = F_o / F_m$	Kvantni prinos (pri t = 0) energijske disipacije
Pokazatelji performansi	
$PI_{ABS} = 1 - (F_o / F_m) M_o / V_j \times F_m / F_o F_o \times 1 - V_j / V_j$	Pokazatelj performansi za energetska učinkovitost od fotona apsorbiranih od PSII do redukcije elektrona međusustava

Tablica 1. Identifikacijske oznake, imena, te pedigrei hibrida korištenih za postavljanje pokusa

Tablica 2. Datumi sjetve, berbe i metličanja, te broj dana od sjetve do cvatnje i od sjetve do berbe

Tablica 3. Analiza varijance (ANOVA) prinosa zrna

Tablica 4. Analiza varijance (ANOVA) vlage zrna u berbi

Tablica 5. Analiza varijance (ANOVA) Fv/Fm u cvatnji

Tablica 6. Analiza varijance (ANOVA) PI_{ABS} u cvatnji

Tablica 7. Komponente varijance za svojstva prinos zrna, vlaga, te PI_{ABS}

Tablica 8. Koeficijenti Pearsonovih produkt-moment korelacija (iznad dijagonale) i genetičkih korelacija izračunatih iz matrice genetičke varijance-kovarijance dobivene mješovitim modelom, te standardne greške procjena

Tablica 9. Komponente varijance, heritabilnosti i korelacije s izvornim svojstvima za predviđene vrijednosti prinosa i vlage zrna

Slika 1. Pokusni kombajn Gleaner F2 u radu (foto: Vlatko Galić).

Slika 2. Štipaljka za adaptaciju na tamu na listu na klip cvatuće biljke kukuruza (lijevo) i mjerenje fluorescencije klorofila *a* u polju ručnim fluorometrom (desno) (foto: Vlatko Galić).

Slika 3. Standardne štipaljke koje se koriste u postupku mjerenja fluorescencije (foto: Vlatko Galić).

Slika 4. Kumulativne količine oborina u mjesecu kada je provedeno mjerenje fluorescencije klorofila *a* za 2017. (A), 2018. (B), 2019. (D) godinu te temperatura i relativna vlažnost zraka u vrijeme mjerenja. Na slikama A, B i C datumi mjerenja označeni su tamnom strelicom.

Slika 5. Handy PEA uređaj (izvor: <http://www.hansatech-instruments.com/>).

Slika 6. Srednje dnevne temperature za 2017. godinu u odnosu na višegodišnji prosjek (1961. – 1990.) na lokaciji Osijek (izvor: Državni hidrometeorološki zavod).

Slika 7. Srednje dnevne temperature za 2018. godinu u odnosu na višegodišnji prosjek (1961. – 1990.) na lokaciji Osijek (izvor: Državni hidrometeorološki zavod).

Slika 8. Srednje dnevne temperature za 2019. godinu u odnosu na višegodišnji prosjek (1961. – 1990.) na lokaciji Osijek (izvor: Državni hidrometeorološki zavod).

Slika 9. Kumulativna količina oborina od sjetve do berbe za 2017., 2018. i 2019. godinu.

Slika 10. Prikaz biplot učinaka genotipa i interakcije genotip-okolina (GGE) za prinos zrna te „idealni hibrid“ (strelica unutar kruga) za ispitivane okoline.

Grafikon 1. Srednje vrijednosti i standardne greške prinosa zrna svih 16 ispitivanih hibrida za 2017., 2018. i 2019. godinu. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Grafikon 2. Srednje vrijednosti i standardne greške prinosa zrna 16 ispitivanih hibrida kroz sve tri godine istraživanja. Različita prva slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Grafikon 3. Srednje vrijednosti i standardne greške vlage zrna u berbi svih 16 ispitivanih hibrida za 2017., 2018. i 2019. godinu. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Grafikon 4. Srednje vrijednosti i standardne greške vlage zrna u berbi 16 ispitivanih hibrida kroz sve tri godine istraživanja. Različita prva slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Grafikon 5. Srednje vrijednosti i standardne greške Fv/Fm u cvatnji svih 16 ispitivanih hibrida za 2017., 2018. i 2019. godinu. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Grafikon 6. Srednje vrijednosti i standardne greške Fv/Fm u cvatnji 16 ispitivanih hibrida kroz sve tri godine istraživanja. Različita prva slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Grafikon 7. Srednje vrijednosti i standardne greške PI_{ABS} u cvatnji svih 16 ispitivanih hibrida za 2017., 2018. i 2019. godinu. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Grafikon 8. Srednje vrijednosti i standardne greške PI_{ABS} u cvatnji 16 ispitivanih hibrida kroz sve tri godine istraživanja. Različita prva slova predstavljaju statistički značajne razlike pri $\alpha=0,05$.

Grafikon 9 . Nativni tranzijenti fluorescencije klorofila *a* u cvatnji kroz tri godine istraživanja prosječno za sve ispitivane hibride.

Grafikon 10.. Normalizirani tranzijenti fluorescencije klorofila *a* u cvatnji kroz tri godine istraživanja prosječno za sve ispitivane hibride.

Grafikon 11. Iznos greške modela (RMSEP) s biofizičkim parametrima fluorescencije klorofila *a* kao prediktorima povećanjem broja latentnih varijabli.

Grafikon 12. Vrijednosti pondera pojedinih biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a* u PLS modelu s četiri latentne varijable za predviđanje prinosa zrna.

Grafikon 13. Iznos greške modela (RMSEP) s tranzijentima fluorescencije klorofila *a* kao prediktorima s povećanjem broja latentnih varijabli.

Grafikon 14. Vrijednosti pondera tranzijenata fluorescencije klorofila *a* u PLS modelu s deset latentnih varijabli za predviđanje prinosa zrna.

Grafikon 15. Vrijednosti prinosa zrna predviđene kalibriranim PLS modelom korištenjem 58 biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a*.

Grafikon 16. Vrijednosti prinosa zrna predviđene kalibriranim PLS modelom korištenjem 118 tranzijenata fluorescencije klorofila *a*.

Grafikon 17. Iznos greške modela (RMSEP) s biofizičkim parametrima fluorescencije klorofila *a* kao prediktorima povećanjem broja latentnih varijabli.

Grafikon 18. Vrijednosti pondera pojedinih biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a* u PLS modelu s četiri latentne varijable za predviđanje vlage zrna u berbi.

Grafikon 19. Iznos greške modela za predviđanje vlage zrna u berbi (RMSEP) s tranzijentima fluorescencije klorofila *a* kao prediktorima s povećanjem broja latentnih varijabli.

Grafikon 20. Vrijednosti pondera tranzijenata fluorescencije klorofila *a* u PLS modelu s deset latentnih varijabli za predviđanje vlage zrna u berbi.

Grafikon 21. Vrijednosti vlage zrna u berbi predviđene kalibriranim PLS modelom korištenjem 58 biofizičkih parametara fluorescencije klorofila *a*.

Grafikon 22. Vrijednosti vlage zrna u berbi predviđene kalibriranim PLS modelom korištenjem 118 tranzijenata fluorescencije klorofila *a*.

Grafikon 23. Efikasnosti indirektne selekcije za prinos zrna putem vrijednosti predviđenih modelom korištenjem biofizičkih parametara i tranzijenata fluorescencije klorofila *a*.

Grafikon 24. Efikasnosti indirektne selekcije za vlagu zrna u berbi putem vrijednosti predviđenih modelom korištenjem biofizičkih parametara i tranzijenata fluorescencije klorofila *a*.

ŽIVOTOPIS

Mirna Volenik rođena je 05. veljače 1980. godine u Osijeku. Osnovnu i srednju, Prirodoslovno-matematičku gimnaziju, završila je u Osijeku gdje je 1998. godine upisala diplomski studij na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku. Diplomirala je 26. lipnja 2006. godine s temom „Utjecaj relativne vlage zraka i temperature na vlagu uskladištenog sjemena ratarskih kultura“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlatke Rozman te stekla zvanje diplomiranog inženjera poljoprivrede ratarskog smjera. Akademske godine 2012./2013. na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku upisala je poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti, smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo.

Godine 2002. dobila je Stipendiju grada Osijeka na osnovu prosjeka ocjena.

Tijekom ljeta 2003. i 2004. godine radila je na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku strnih žitarica Poljoprivrednog instituta Osijek gdje je obavljala poslove u žetvi pšenice i ječma. Od 11. travnja 2005. do 31. listopada 2006. godine radila je na Poljoprivrednom institutu Osijek na radnom mjestu tehničara na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku industrijskog bilja. Od 01. studenog 2006. godine do 31. prosinca 2011. godine radila je kao stručni suradnik – tehnolog na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku industrijskog bilja, a od 01. siječnja 2012. godine radi kao stručni suradnik – tehnolog na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku kukuruza.

U Hrvatskom centru za poljoprivredu, hranu i selo, Centar za sjemenarstvo i rasadničarstvo, položila je 22. siječnja 2015. godine za Nadzornika nad sjemenskim usjevima kukuruza. Također u Hrvatskom centru za poljoprivredu, hranu i selo, Centar za sjemenarstvo i rasadničarstvo. 14. prosinca 2017. godine uspješno je završila obuku za uzorkivača poljoprivrednog sjemena.

Aktivno se služi engleskim jezikom u govoru i pismu, te posjeduje znanje španjolskog jezika razine III stupnja. Poznaje rad na računalu (Windows paket programa) te komunikaciju putem e-maila, interneta i drugih komunikacijskih programa.