

НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

**Предмет: Извештај комисије за оцену урађене докторске дисертације
Сање Микић, дипл. инж.**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду од 26.11.2014. године, именована је Комисија за оцену и одбрану урађене докторске дисертације дипл. инж. Сање Микић (рођ. Трескић) под насловом: „Молекуларна и фенотипска карактеризација НС инбред линија кукуруза“.

Комисија у саставу: др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Славен Продановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Анкица Кондић Шпика, виши научни сарадник Института за ратарство и повртарство у Новом Саду, др Томислав Живановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Александра Настасић, виши научни сарадник Института за ратарство и повртарство у Новом Саду прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Сање Микић написана је на 162 странице, у оквиру којих се налази 50 табела, 21 графикана и 4 слике. Испред основног текста налази се резиме са кључним речима на српском и енглеском језику, као и приказ садржаја. У докторској дисертацији је цитирано и у литератури наведено 284 референци.

Дисертација се састоји из следећих поглавља: 1. Увод (стр. 1-3), 2. Циљ истраживања (стр. 4), 3. Преглед литературе (стр. 5-21), 4. Радна хипотеза (стр. 22), 5. Материјал и методе рада (стр. 23-44), 6. Резултати и дискусија (стр. 45-127), 7. Закључак (стр. 128-129), 8. Литература (стр. 130-153) и 9. Прилог (стр. 154-162).

2. Приказ и анализа докторске дисертације

У поглављу **Увод** докторске дисертације, наведен је значај, распрострањеност, површине под којима се гаји и просечан принос зрна кукуруза у Србији и свету. Дата је систематика кукуруза, набројани су његови најближи сродници и раније важећи називи подврста кукуруза. Указано је на тетраплоидно порекло кукуруза и дат је кратак осврт на еволуцију ове биљне врсте. Описано је ширење кукуруза из центра порекла у Европу и његово прилагођавање агроеколошким условима на Балкану. Истакнут је велик диверзитет кукуруза који се огледа у великом броју форми и варијабилности особина.

Циљ рада је био да се фенотипски оцене агрономски значајне особине кукуруза и анализирају инбред линије микросателитским маркерима како би се на основу ових анализа урадила класификација генотипова и процениле генетичке удаљености међу њима. Такође, циљ рада је био утврђивање алелне варијабилности, идентификација алела карактеристичних за одређене генотипове или хетеротичне групе и утврђивање потенцијално значајних веза између маркера и агрономски важних својстава применом асоцијативне анализе, са циљем даље примене у маркера у селекцији.

У поглављу **Преглед литературе** изнети су доступни литерарни извори из области која је предмет проучавања ове докторске дисертације. Наведени су чиниоци који доприносе великој варијабилности кукуруза, начине коришћења ове варијабилности, њен практични значај за производњу и оплемењивање, као и њен теоријски значај за разумевање генетичке основе комплексних особина. Дат је детаљан преглед карактеристика генома кукуруза: број хромозома, величина генома, процењени број гена, проценат понављајућих секвенци, улога дуплираних гена и транспозона, фреквенција различитих мутација и епигенетичке појаве. Затим је објашњено како су доместикација и селекциони притисак утицали на смањивање диверзитета одређеног броја гена фиксирањем једних, и губитком других у популацији. Напоменут је утицај открића хетерозиса на почетак гајења хибрида и класификације инбред линија у хетеротичне групе према својим комбинационим способностима. Истакнут је значај карактеризације инбред линија за потребе оплемењивачких програма и како се она спроводи на фенотипском и молекуларном нивоу са освртом на њихове предности и недостатке. Детаљније су приказана својства, заступљеност, начини настанка, улога, предности и примена микросателитских маркера, са даљом елаборацијом о могућностима примене селекције помоћу маркера и принципима мапирања. Приказан је начин којим се утврђују везе маркера и особина асоцијативном анализом и представљени су досадашњи резултати и најновији приступи код асоцијативног мапирања кукуруза.

У **Радној хипотези** кандидаткиња је пошла од претпоставке да је изабрани сет инбред линија кукуруза довољно дивергентан да обухвати велики број алела на већем броју локуса. Такође се претпоставља да су фенотипски и микросателитски маркери довољно полиморфни за дискриминацију линија по изабраним својствима. Очекује се да ће се применом асоцијативне анализе утврдити статистички значајне везе између микросателитских локуса и изабраних агрономских особина.

У поглављу **Материјал и методе** рада приказани су генотипови кукуруза коришћени у истраживању, план пољских огледа, начин на који су извођени пољски и лабораторијски огледи и статистички методи који су се користили за обраду фенотипских и генотипских података.

Биљни материјал који се користио за истраживање састојао се од 96 инбред линија кукуруза Института за ратарство и повртарство у Новом Саду (НС инбред линије) сврстаних у четири хетеротичне групе: *BSSS*, *Lancaster*, *Iodent* и независну групу. Двогодишњи огледи постављени су по потпуно случајном блок систему у три понављања. Прве године оглед је посејан на три локалитета: Римски Шанчеви, Србобран и Сомбор, док је друге године оглед постављен на Римским Шанчевима и у Србобрану. Фенотипска оцена инбред линија кукуруза урађена је према *UPOV* и *SIMMYT/ICPGR* дескрипторима за следеће особине: време цветања мушке и женске цвасти, висина биљке, дужина клипа, пречник клипа, број редова зрна, као и за агрономски значајне особине: период између цветања мушке и женске цвасти, висину

биљке до клипа, број листова изнад примарног клипа, укупан број листова, масу 1000 зрна и принос по биљци.

У лабораторијским огледима, кандидаткиња је урадила молекуларну карактеризација инбред линија применом 36 микростелитских маркера који су према литературним подацима доведени у везу са важнијим агрономским особинама. Изолација ДНК је урађена је из клијанаца по измењеном протоколу *Doyle & Doyle* (1990), док су концентрација и квалитет ДНК одређени спектофотометријски. Ланчаном реакцијом полимеразе умножене су микросателитске секвенце помоћу флуоресцентно обележених прајмера и анализирани капиларном електрофорезом помоћу аутоматског секвенцера.

Статистика за диверзитет генских локуса израчуната је помоћу програмских пакета *PowerMarker*, *Genalex* и *Arlequin* и описана помоћу следећих показатеља диверзитета: диверзитет алела, ефективни број алела, број ретких алела, Шенонов индекс, диверзитет гена или очекивана хетерозиготност, запажена хетерозиготност, полиморфност појединачних локуса и коефицијент инбридинга.

Применом молекуларних маркера урађене су три независне кластер анализе: кластер анализа заснована на параметријском моделу, *UPGMA* модел и анализа главних координата. За утврђивање популационе структуре одабраних генотипова коришћен је програм *STRUCTURE 2.3.4* који се заснива на параметријском моделу дистрибуције фреквенција непознатог броја популација. Груписање генотипова је урађено на основу независних фреквенција алела 36 независних микросателитских маркера. Примењен је мешовити модел који подразумева да један генотип може припадати једној групи или више њих, уколико делови генома потичу из више изворних популација. Други приступ за одређивање популационе структуре заснован је на Еуклидовим одстојањима и урађен је у програму *PowerMarker v3.25* применом непондерисаног метода груписања парова са аритметичком средином. Анализа главних координата је примењена у програму *XLSTAT 2010* како би се пронашли и представили односи између инбред линија на основу главних координата.

Статистичка обрада фенотипских података обухватила је: дескриптивну статистику, анализу варијансе значајности разлика испитиваних особина, линеарне корелације између особина и мултиваријациону анализу главних компоненти.

Анализа гаметске неравнотеже (*linkage disequilibrium*) урађена је у програму *TASSEL 2.1*. применом Фишеровог егзактног теста, док су везе између маркера и особина утврђене у истом програму применом општег и мешовитог линеарног модела.

Поглавље **Резултати и дискусија** представља најважнији део докторске дисертације. Резултати и дискусија истраживања се састоје од потпоглавља која се односе на молекуларну карактеризацију, фенотипску карактеризацију и асоцијативну анализу инбред линија кукуруза.

Резултати анализе *Генетичке варијабилности микросателита* кукуруза указују на велику полиморфност већине маркера. Тридесет и шест парова прајмера амплификовало је укупно 297 алела, просечно осам алела по локусу. Након издвајања алела са фреквенцијом мањом од 5%, сваки локус је у просеку имао четири алела. Трећина испитиваних локуса имала је осам и више алела, више од четири ефективних алела, очекивану хетерозиготност преко 0,75 и полиморфност појединачних локуса (*PIC* вредност) изнад 0,72. Само шест маркера је имало *PIC* вредност испод 0,5. Маркери са динуклеотидним поновцима су у просеку имали већу полиморфност (*PIC* 0,67), од маркера са три-, четворо-, и петонуклеотидним поновцима (*PIC* 0,57, 0,58 и

0,53, редом). Диверзитет локуса изражен Шеноновим индексом износио је у просеку 1,5, а кретао се од 0,899 до 2,457. Четири маркера (*umc1035*, *bnlg666*, *dupssr10* и *bnlg162*) имала су алеле који су били јединствени за више од 10% инбред линија.

Анализа структуре популације заснована на параметријском моделу утврђена је за претпостављени број кластера од 1 до 6 и са пет понављања за сваки кластер, а стваран број од две групе инбред линија кукуруза је одређен помоћу метода највеће вероватноће и Евановог модела. Ови резултати одговарају подели инбред линија на *BSSS* хетеротичку групу и остале (*non-BSSS*) групе. Анализом обе групе понаособ утврђено је даље структурирање унутар њих, чиме су се издвојиле независне и *Iodent* линије из *Lancaster* хетеротичне групе.

Кластер анализом, применом *UPGMA* метода, сви генотипови кукуруза су сврстани у пет група. Две највеће групе чине линије *BSSS* и *Lancaster* хетеротичне групе, две линије које потичу из популације европских тврдунаца груписане су у посебан кластер, три линије егзотичне гермплазме преклом у Јужне Америке чине четврти кластер, док пети кластер чине линија из синтетичке популације *BSSS* са линијом независног генетичког материјала. Све *Iodent* линије налазе се у једном кластеру у оквиру већег *Lancaster* кластера.

Анализа структуре популације кукуруза засноване на анализи главних координата раздвојила је инбред линије које припадају *Iodent* и независној хетеротичкој групи од *Lancaster* и *BSSS* хетеротичне групе помоћи прве координате, док је друга координата раздвојила последње две групе: *Lancaster* и *BSSS* хетеротичну групу. Прва координата раздвојила је инбред линије *BSSS* линије на оне које су у типу *B73*, у доњу половину дијаграма, и остале, у горњу половину. *BSSS* хетеротична група била је хомогенија од *Lancaster* групе. *Iodent* инбред линије и линије независне хетеротичне групе груписале су се ближе *Lancaster*, него *BSSS* генотиповима. Распоред инбред линија кукуруза на дијаграму добијеном анализом главних координата углавном је била у сагласности са кладограмом инбред линија добијених кластер анализом применом *UPGMA* метода, параметријским моделом, познатим подацима о припадности хетеротичким групама и педигреима за већину генотипова.

Подела инбред линија на две групе анализом структуре популације засноване на параметријском моделу у сагласности је са општом поделом инбред линија на *BSSS* хетеротичну групу и остале (*non-BSSS*) групе, али се објашњава и постојањем хијерархијске структуре односно карактеристике метода да проналази највиши ниво структуре у датом сету података. Општа сагласност груписања линија анализом структуре популације засноване на параметријском моделу, анализом главних координата и *UPGMA* методом са постојећим хетеротичним групама кукуруза поткрепљена је доступним литерарним наводима, наглашавајући улогу молекуларних маркера у разјашњавању подигреа и оцени односа између линија. Кандидаткиња је у свом истраживању дошла до закључка да би придруживања генотипова непознатог или мешовитог порекла хетеротичним групама, на основу молекуларних података, требало потврдити пољским огледима, утврђивањем комбинационих способности са тестерима различитих хетеротичних група.

У потпоглављу *Поређење фреквенција алела две групе кукуруза* тестирањем разлика фреквенција утврђених алела инбред линија које припадају двома највећим хетеротичним групама, а уједно и групама издвојених кластер анализом, утврђено је 17 алела 12 маркера чије се фреквенције статистички значајно разликују на нивоу значајности од 5%. Око 38% укупног броја алела утврђено је само код једне групе. *BSSS* група је имала двоструко више алела који су били својствени само *BSSS* групи

(24%) него *Lancaster* (14%). Већина алела својствених само једној групи имали су ниске фреквенције. Утврђена је већа дивергентност инбред линије *BSSS* групе у односу на инбред линије *Lancaster* хетеротичне групе. Резултати анализе молекуларне варијансе показали су да је унутарпопулациона варијација много већа од варијације између популација.

Релативно велики број детектованих алела са мањим бројем коришћених маркера у поређењу са резултатима других истраживања указује на велику полиморфност изабраних *SSR* маркера и на велику варијабилност инбред линија. Велики број детектованих алела је, такође, резултат веће заступљености динуклеотидних поновака, као и веће резолуције и моћи детекције коришћене капиларне електрофорезе у односу на агарозни или полиакриламидни гел. Просечна *PIC* вредност, показатеља полиморфности маркера, није знатно одступала од ове вредности у другим истраживањима. Иако је ефекат већег процента ретких алела на ниже вредности параметара генетичког диверзитета потврђен и у другим истраживања, истакнут је њихов значај у процесу селекције кукуруза.

Постојање алела специфичних за поједине линије и хетеротичне групе објашњено је вештачком селекцијом и генетичким дрифтом и истакнуто је, сабирањем резултата других аутора, да ови алели бити извор пожељних гена и генетичке варијабилности потребне за даље оплемењивање кукуруза и анализу квантитативних особина.

Релативно мале вредности мера *Гаметске неравнотеже*, коефицијент корелације између већине парова локуса $<0,1$ и стандардизовани коефицијент неравнотеже $<0,5$ код 45% парова физички везаних локуса, указују истовремено да је рекомбинација између маркера мања од очекиване и да гаметска неравнотежа није великог интезитета, иако је статистички значајна.

Дескриптивна статистика фенотипских података кукуруза, преко показатеља средњих вредности за сваку особину, указује на значајну варијабилност испитаног сета инбред линија. Највеће варирање утврђено је код броја дана од метличења до свилања са коефицијентом варијације од 36,8%, а најмање код броја дана од сетве до свилања са коефицијентом варијације 4,7%.

Испитиване *НС* инбред линије обухватиле су велики део укупне варијабилност агрономски важних особина и показале су се погодним генетичким материјалом за асоцијативну анализу. Закључено је да је велика варијабилност испитиваних особина последица не само дивергентност генотипова, већ и утицај еколошких чинилаца, нарочито веома сушних услова који су запажени у двогодишњем периоду истраживања.

Кластер анализа фенотипских података применом UPGMA кукуруза груписало је инбред линије према трима хетеротичним групама: *BSSS*, *Lancaster* и независној групи, али је уочено више одступања и неправилности у груписању. Резултати кластер анализе фенотипских података *UPGMA* методом били су у мањој мери сагласни са педигреима линија, него што су били резултати исте анализе засновани на молекуларним подацима. Потврду резултата кандидаткиња је пронашла у претходним истраживањима закључујући да квантитативне фенотипске особине, под сложеним генетичким механизам контроле, нису толико поуздане за класификацију генотипова.

Анализом главних компоненти фенотипских података кукуруза пројекције изворних променљивих (особина) и генотипова између прве две главне компоненте омогућују сагледавање одређених карактеристика анализираних инбред линија. Већина

линија *Lancaster* групе груписала се дуж вектора који одговарају особинама дужина клипа и број зрна у реду клипа, док су се *BSSS* линије груписале дуж вектора који одговарају особинама: пречник клипа, број редова зрна, укупан број листова и број листова изнад клипа. Овакав распоред указује на особеност *Lancaster* линија да у просеку имају дуже и уже клипове, а *BSSS* линија шире и краће, као и већи број интернодија, тј. листова. Линије независне хетеротичне групе, које потичу од европских тврдунаца, пројектоване су у супротном смеру од смера пружања вектора дефинисаних временом, висином биљака и приносом зрна по биљци што је у сагласности са њиховом раностасношћу, ниским хабитусом и малом родношћу. Анализирани *Iodent* линије биле су у просеку раностасније и ниже у односу на *Lancaster* и *BSSS* линије, групишући се углавном насупрот векторима за време цветања и висину. Ни *Lancaster* и ни *BSSS* линије нису показале склоност груписању дуж вектора који се односи на време цветања, висину или принос, неиспољавајући особеност у погледу ових особина.

Анализа варијансе фенотипских података указала је на постојање статистички значајних разлика у испитиваним особинама између проучаваних инбрид линија. Значајан извор варијације особина били су године, локалитети и интеракције између ових фактора. Код већине особина, после генотипова, године су биле извор варијације са највећом сумом квадрата. Статистички значајне разлике између година мерења утврђене су код свих особина, док су између локалитета разлике утврђене код већине, али не свих особина.

Статистички значајне веома високе позитивне корелације установљене су између времена метличења и времена свилања ($r=0,937$). Високе позитивне корелације одређене су за висину биљке и висину биљке до примарног клипа ($r=0,788$), укупног броја листова и броја листова изнад примарног клипа ($r=0,693$), ширине клипа и броја редова зрна на клипу ($r=0,726$), и дужине клипа и броја зрна у реду клипа ($r=0,706$). Средње позитивне корелације израчунате су за број дана од сетве до метличења и број дана од метличења до свилања ($r=0,415$), указујући да је код касностасних генотипова појава свиле каснила услед подударња са периодом са већим температурама и недостатком земљишне и ваздушне влаге. Раностаснији генотипови били су нижи, што потврђује позитивне корелације између висине биљке до клипа и времена цветања ($r=0,469$; $0,462$) и између висине биљке и времена цветања мушке и женске цвасти ($r=0,269$; $0,264$).

Применом општег и мешовитог линераног модела утврђено је постојање статистички значајних веза 21 маркера са 13 фенотипских особина. Маркер *bnlg162* имао је значајне везе са осам особина, *umc1025* са седам, а *bnlg1237* са пет особина. На основу укупног броја веза између маркера и својстава добијених применом оба модела, издвојена су три маркера (*bnlg162*, *umc1025* и *bnlg1237*) који су имали највећи број стабилних веза (15, 14 и 12, редом) са већим бројем својстава. Позитиван ефекат на принос по биљци имали су алели 214 bp и 256 bp маркера *bnlg162*; алели 107 bp, 111 bp и 113 bp маркера *umc1025* и алели 152 bp, 154 bp и 172 bp маркера *bnlg1237*. Генотипови који су више рангирани по приносу имали су већи број алела са позитивним ефектом, при чему је Спирмановог коефицијент корелације био статистички значајан и износио је $-0,67$. Анализом обе хетеротичне групе засебно идентификовани су алели са позитивним ефектом на принос специфичних за одређену групу. Код *Lancaster* групе утврђено је 47 алела 26 маркера са позитивним ефектом на принос у свим локалитетима и годинама, док је код *BSSS* групе пронађено 17 алела 14 маркера. Четвртина алела са позитивним ефектом на принос присутних у *Lancaster*

групи и око 30% алела са позитивним ефектом на принос код *BSSS* групе су ретки алели.

Пронађене статистички значајне везе између маркера и особина, стабилне у свим испитиваним срединама, а које су, такође, потврђене у другим истраживањима указују на постојање генетичких фактора који контролишу сложене биохемијске, метаболичке и физиолошке процесе који позитивно утичу на фитнес и посредно на пожељне агрономске особине, и на велику могућност примене ових маркера. Резултати овог истраживања могу бити од велике користи у селекцији инбред линија које носе алеле са позитивним ефектом на пожељне особина, стога кандидаткиња предлаже наставак испитивања тестирањем комбинационих способности линија чиме би се потврдиле веза између маркера и својства.

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је изнела и сабрала у кратким тезама најважније резултате својих проучавања. Закључено је да је велика полиморфност коришћених маркера (297 алела, $N_a=8$, $PI_C=0,40-0,85$) указује на могућност њихове примене у карактеризацији генетичког материјала у оплемењивачким програмима и фингерпринтингу инбред линија и хибрида кукуруза. Такође је закључено да комбинација више метода кластер анализе заснованих на молекуларним подацима даје јаснији увид у структуру популације инбред линија од примене појединачних метода. Истакнуто је да су значајан извор варијације фенотипских особина биле године, као и локалитети и интеракције ($p<0,0001$) између ових фактора, што указује на велики утицај еколошких чинилаца на стабилност особина. Резултати кластер анализе молекуларних података били су у већој мери сагласни са педигреима линија и боље су груписали инбред линије у хетеротичне групе, него резултати засновани на фенотипским подацима. Резултати анализе молекуларних (76% инбред линија са алелима јединственим алелима и просечно 2,5 јединствених алела за сваку инбред линију) и фенотипских података ($CV=4.7-36.8\%$) указују на велику варијабилност испитиваних генотипова, што их чини погодним за асоцијативну анализу. Назначено је да би маркери (*bnlg162*, *umc1025* и *bnlg1237*) који су имали статистички значајне везе са пожељним агрономским особинама, стабилним у више средина могли имати велики значај у маркер асистираној селекцији, након потврде веза између маркера и својства тестирањем комбинационих способности линија и при стварању хибрида.

У поглављу **Литература** наведен је списак од 284 референци које су у докторској дисертацији коришћене као основ за примењене методе истраживања и за поређење добијених резултата са другим истраживањима. Референце су сложене по абецедном реду и написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација Сање Микић (рођ. Трескић), под насловом: „Молекуларна и фенотипска карактеризација НС инбред линија кукуруза“ представља оригиналан научни рад из генетике, битехнологије и оплемењивања кукуруза. Циљ овог рада је била је карактеризација, класификација инбред линије кукуруза на фенотипском и молекуларном нивоу, идентификација алела карактеристичних за одређене генотипове или хетеротичне групе и утврђивање потенцијално значајних веза између маркера и агрономски важних својстава применом асоцијативне анализе, са циљем даље примене у маркера у селекцији. Утврђена је велика полиморфност *SSR*

маркера и велики диверзитет изабраних инбред погодних за асоцијативну анализу. Такође је дата предност молекуларној анализи у класификацији инбред линија над фенотипском оценом. Утврђен је већи број алела маркера са позитивним ефектом на принос у више средина и указано је на значај већег броја *QTL* са малим појединачним ефектима у контроли квантитативних особина са нагласком на неопходност примене великог броја маркера везаних за *QTL* за важна агрономска својства у селекцији.

Истраживања у докторској дисертацији обављена су у потпуности према програму предвиђеном у пријави. Посебно треба истаћи да резултати које је Сања Микић добила у својим истраживањима представљају оригинална решења и драгоцено искуство за даљи оплемењивачки рад на кукурузу.

Узимајући у обзир све наведено, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Сање Микић, под насловом: „Молекуларна и фенотипска карактеризација НС инбред линија кукуруза“, и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета и Београду да ову оцену усвоји, чиме би си пружила могућност кандидату да приступи јавној одбрани ове докторске дисертације.

Београд, 28.11.2014.

Чланови Комисије:

Др Гордана Шурлан Момировић, редовни професор
Пољопривредног факултета Универзитета у Београду
(Генетика)

Др Славен Продановић, редовни професор
Пољопривредног факултета Универзитета у Београду
(Оплемењивање биљака)

Др Анкица Кондић Шпица, виши научни сарадник
Института за ратарство и повртарство
(Биотехнологија биљака)

Др Томислав Живановић, редовни професор
Пољопривредног факултета Универзитета у Београду
(Оплемењивање биљака)

Др Александра Настасић, виши научни сарадник
Института за ратарство и повртарство
(Оплемењивање биљака)

Прилог:

Рад Сање Микић објављен у часопису који је на SCI листи:

1. Boćanski, J., Nastasić, A., Stanisavljević, D., Srećkov, Z., Mitrović, B., Treskić, S., Vukosavljev, M. (2011): Biplot analysis of diallel crosses of NS inbred lines. Genetika 43 (2): 277-284