

## **KONTROLA GENETSKOG IDENTITETA ELEKTROFOREZOM PROTEINA PRI SORTNOJ REPRODUKCIJI PŠENICE**

### **CONTROL OF GENETIC IDENTITY BY PROTEIN ELECTROPHORESIS IN VARIETAL REPRODUCTION OF WHEAT**

**N. Đurić, Gorica Cvijanović, Mirela Matković,  
Gordana Dozet, Gordana Branković**

#### **SAŽETAK**

Održanje i kontrola genetske čistoće, odnosno genetskog identiteta, jedan je od krajnjih ciljeva sjemenarstva nakon priznavanja neke sorte pšenice. Primjena pozitivne i negativne selekcije, na razini fenotipa pri sortnoj reprodukciji pšenice, omogućila je sortnu čistoću od 99 i 100% u usjevima svih sjemenskih kategorija.

U cilju ispitivanja genetske identičnosti, u ovom su radu analizirane rezervne bjelačevine pšenice – glijadini, koji su metodom poliakrilne gel elektroforeze razdvojeni na veliki broj frakcija koje pokazuju visoku heterogenost. Od analiziranih sorti pšenice jedino je sorta PKB Rodika imala genetsku čistoću od 100% za sve kategorije sjemena. Sorta PKB Kristina je imala genetsku čistoću od 99% za kategoriju predosnovno sjeme, a sorta BG Merkur 99% genetske čistoće za kategoriju – sjeme prve generacije C1.

Elektroforeza bjelančevina pokazala je da postoji divergentnost između ispitivanih sorti pšenice po sastavu komponenti glijadinske frakcije, dok unutar sorti postoji ujednačenost.

Ključne riječi: pšenica, genetski identitet, elektroforeza proteina

#### **ABSTRACT**

Maintenance and control of genetic purity and genetic identity is one of the ultimate goals in seed production after the recognition of some varieties of wheat. The application of positive and negative selection at the phenotypic level in varietal reproduction of wheat, enabled 99 and 100% of varietal purity in crops of all seed categories.

In order to study the genetic identity, in this paper the reserve proteins of wheat – gliadins were analyzed. They were separated by polyacrylic gel electrophoresis into numerous components that showed great heterogeneity.

Of all the analyzed wheat varieties, only PKB Rodika variety had the genetic purity of 100% in all categories of seed. PKB Kristina had the genetic purity of 99% in the pre-basic seed category and the variety BG Merkur had genetic purity of 99% in the seed of first generation – C1.

Protein electrophoresis showed there was the divergence among the varieties of wheat in its composition of gliadin fractions, while there was uniformity among different varietal reproductions within each variety.

Key words: wheat, genetic identity, protein electrophoresis.

## UVOD

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je jedna od najranijih udomaćenih biljnih kultura koja se uzgaja na svim kontinentima. Široka rasprostranjenost moguća je zbog kompleksnosti genoma pšenice (Denčić i sur., 2009).

Svrha proizvodnje sortnog sjemena nije samo širenje nove sorte u proizvodnji nego i održavanje njenog genetskog identiteta u prostoru i vremenu. Neophodno je da se iz godine u godinu reproducira onakav genetski identitet sorte kakav je on bio kada je sorta priznata (Denčić i sur., 2012). Dakle, održavanje genetske uniformnosti sorti je jedan od preduvjeta uspješne proizvodnje i plasiranja na tržište komercijalnog sjemena pšenice.

Postoje različite metode za identifikaciju sorte identičnosti pšenice analizom rezervnih bjelančevina. Elektroforeza proteina je metoda koja pruža informacije o sortnoj identičnosti, polimorfizmu proteina i ostalim tehnološkim karakteristikama pšenice (Menkovska i sur., 2002).

Glijadini i glutenini su genetski kontrolirane rezervne bjelančevine čiji je aminokiselinski sastav identičan u svakom zrnu date sorte, kao otisak prsta. Lako ih je ekstrahirati i samim time koristiti u identifikaciji sorti pšenice (Lookhart i sur., 2004). Glijadini su jedne od najvažnijih frakcija bjelančevina, koje su deponirane u endospermu zrna i predstavljaju učinkovit i pouzdan genetski marker u genetskom proučavanju pšenice (Nikolić, 2010). Analiza glutenina preko elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, također nudi informaciju o sortnoj identičnosti (Kulp, 2000).

Brojni istraživači su se bavili ocjenom genetskog identiteta pšenice, s teorijskog ili praktičnog gledišta. Koristili su različite metode, kao što su fenotipska ocjena temeljena na deskriptoru, elektroforeza i primjena molekularnih markera. Tradicionalno, genetska čistoća sjemena se određivala praćenjem morfoloških osobina biljaka u različitim fazama razvoja u poljskim uvjetima. Međutim, morfološke osobine su podložne utjecaj vanjske okoline i nisu pouzdan pokazatelj genotipa, stoga su molekularni i biokemijski markeri korisna dopuna morfološkim markerima (Shuib i sur., 2010; Jiang, 2013).

Vertikalna elektroforeza predstavlja laboratorijsku metodu kojom se prati kretanje koloidnih čestica u gelu pod utjecajem električnog polja, kroz otopine slabog elektrolita (Janson, 2012). Shema dobivenih proteinskih traka naziva se elektroforegram i predstavlja genetičku karakteristiku datog genotipa, koja se odnosi na genetičku konstituciju i smatra se „otiskom“ varijeteta.

Huffman (2004) je proučavanjem genetskog identiteta kod genetski modificiranih (GM) biljaka, došao do zaključka da se pri uzgajanju pšenice pojavljuju tri rizika vezana za promjenu genetičkog identiteta: pojava zaostalih biljaka iz prethodnog usjeva, polenski drift odnosno rasipanje polena drugih biljaka, miješanje sjemena različitih sorti pri „on farm“ manipulaciji. Dong i sur. (2005) ističu da su metode DNK fingerprintinga i AFLP analize pogodne za proučavanje genetskog identiteta kod pšenice i načina nasljeđivanja njenih osobina. Ruiz i sur. (2002) su analizom glijadina ustanovili da dolazi do kvalitativnih promjena genetske varijabilnosti španjolskih germplazmi pšenice tijekom godina, odnosno tijekom održavanja sorti. Za 35 godina 75% analiziranih uzoraka sačuvalo je genetski identitet. Slične rezultate dobio je Đurić (2013) kod sorte PKB Merkur, gdje je čistoća sve tri kategorije sjemena bila 100%.

Dvořáček i sur. (2013) koristeći vertikalnu gel elektroforezu, identificirali su 22 heterogena biotipa pšenice u odnosu na njihove glijadinske alele i podjedinice glutenina. Ustanovili su da postoje međusortne razlike u najvažnijim parametrima kvalitete pšenice i da su značajno više nego razlike koje su zastupljene između različitih biotipova unutar svake ispitivane sorte. Posebna pažnja se pridaje podjedinicama glutenina i alelima glijadina, te njihovim međusobnim interakcijama koje su odgovorne za postojanje značajnih razlika između analiziranih parametara zrna.

## MATERIJAL I METODE

Na pokusnom polju Instituta PKB Agroekonomik, Padinska Skela, postavljen je pokus po slučajnom blok rasporedu s tri ponavljanja tijekom 2011/2012 i 2012/2013. godine. Tip tla na kojem je izveden pokus je ritska crnica i primijenjena je standardna agrotehnika za proizvodnju pšenice.

Kao materijal rada korištene su tri divergentne sorte pšenice (PKB Kristina, PKB Merkur i PKB Rodika), Instituta PKB Agroekonomik koje su priznate u zemljama Europske unije.

Ispitivana su po tri tretmana za svaku od navedenih sorti u pogledu primijene selekcije i gustoće usjeva, koji odgovaraju zahtjevima za proizvodnju tri različite kategorije sjemena: predosnovno sjeme, osnovno sjeme i sjeme C1 sorte reprodukcije.

Sortna identičnost je analizirana metodom vertikalne poliakrilamidne gel (PAGE) elektroforeze. Ova vrsta elektroforeze postala je jedna od najšire korištenih tehnika za separaciju i karakterizaciju rezervnih bjelančevina pšenice.

Elektroforeza predstavlja laboratorijsku metodu koja prati kretanje koloidnih čestica u gelu pod utjecajem električnog polja kroz otopinu slabog elektrolita. Proteini pšenice se ponašaju kao tipične smješe koloidnih čestica.

U ovom radu uzimani su uzorci po 100 zrna. Svako zrno je posebno analizirano, odnosno glijadinske bjelančevine svakog zrna ispitane su u zasebnim kolonama na gelu. Određeno je razlikuju li se i koliko komponente glijadinske frakcije bjelančevina u tri ispitivane varijante jedne sorte, odnosno utvrđena je promjena postotka genetičke identičnosti sorte u različitim kategorijama sjemenskog usjeva. Rezervne bjelančevine glijadina iz ispitivanih uzoraka pšenice ekstrahirane su iz 100 pojedinačnih sjemenki i razdvojene na PAGH pH 3.2. Ukupno su napravljena tri gela po uzorku. Vertikalna elektroforeza je proveden na opremi MAXX FILL, Carl Roth. Pufferi za gel bili su 20 ml glacijalne octene kiseline + jedan gram glicina, koji su dopunjeni destiliranom vodom do jedane litre i čuvani na hladnom mjestu. Pufferi za kadicu bili su 4 ml glacijalne octene kiseline + 0,4 g. glicina, dopunjenih destiliranom vodom do jedne litre i čuvani na hladnom mjestu.

Priprema uzoraka za analizu sastojala se u usitnjavanju zrna pšenice i prebacivanju u ependorficu od 1,5 ml, uz dodatak 300 µl ekstrakcijske otopine (Methyl green – 0,05% u 25% 2-chloroethanolu). Nakon miješanja uzorak je

ostavljen na sobnoj temperaturi 12 sati. Sljedeći dan je izvršeno centrifugiranje na 12400 rpm pet minuta i odvojen je supernatant. Naneseno je 12  $\mu$ l supernatanta u jažice gela za elektroforezu. Postupak dobivanja obuhvatio je sljedeće: čiste i suhe staklene ploče su postavljane u svoje ležište za dovijanje gela, na gornju površinu stavljen je „češalj“ za pravljenje udubljenja za uzorke u gelu, a zatim je u 60 ml pufera za gel dodano 15 g akrilamida (12,5% gel), 0,5 g bis-akrilamida, 7,2 g uree, 0,12 g askorbinske kiseline i 0,006 g ferosulfata. Nakon miješanja i dopune puferom za gel do 120 ml izvršeno je hlađenje pet minuta u zamrzivaču. Dodano je 120  $\mu$ l svježe pripremljenog 10% amonijumpersulfata i 420  $\mu$ l TEMED-a. Nakon miješanja izvršeno je brzo sipanje između stakala unaprijed pripremljenog kalupa za gel. Poslije 50 minuta polimerizacije, izvađeni su češljevi i kalup je prebačen u kadicu za elektroforezu. U svaku jažicu gela dodano je po 12  $\mu$ l ekstrakta iz pojedinačnih zrna pšenice. Elektroforeza je obavljena pri konstantnom naponu struje od 300 V, uz neprekidno hlađenje na temperaturi od 15-20°C, u trajanju od četiri sata.

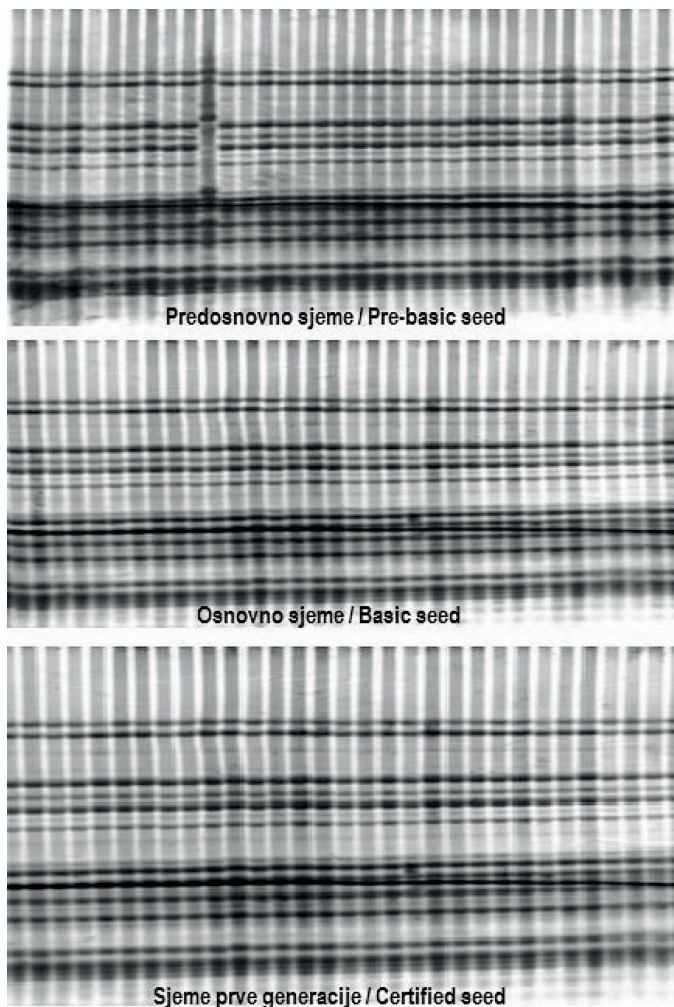
Po završetku elektroforeze gelovi su bojani i tijekom noći ostavljeni potopljeni u boji: 1% PAGE blu (plavu) G 90 u etanolu (10 ml) + 10% triklor-očetna kiselina (200 ml).

Obezbojavanje je izvršeno sa 10% triklor-očetnom kiselinom u trajanju od 30 minuta, a zatim destiliranom vodom. Gelovi su zatim skenirani i sačuvani kao jpg. format. Elektroforeza je obavljena u ovlaštenom laboratoriju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu.

## REZULTATI I RASPRAVA

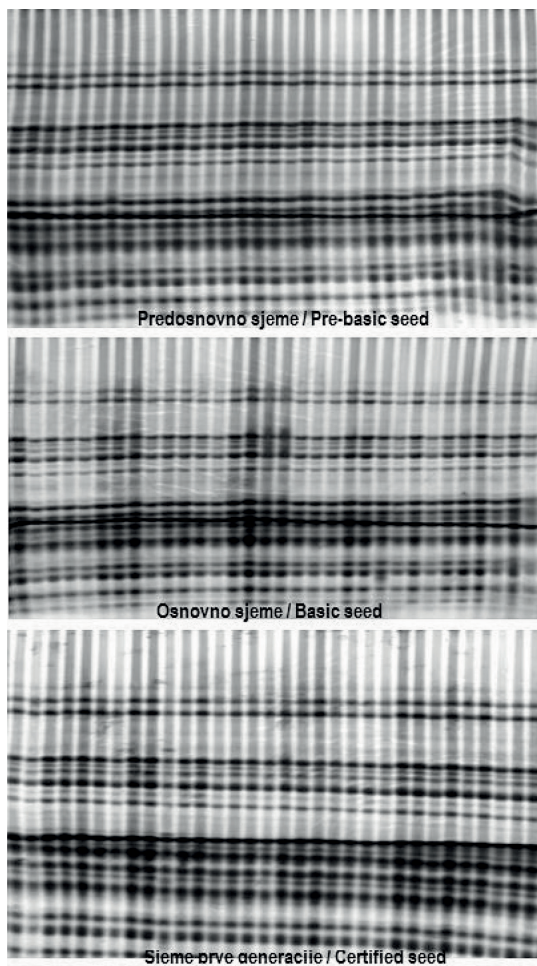
Na slici 1 prikazani su elektroforegrami za sortu PKB Kristina, za kategorije sjemena: predosnovno, osnovno i sjeme prve reprodukcije - C1. Na temelju elektroforegrama može se zaključiti da je sorta PKB Kristina za kategoriju sjemena predosnovno sjeme od 100 ispitivanih zrna imala uniformnost 99. Jedno zrno je bilo različito, što znači da je genetska čistoća iznosila 99,0%.

Sorta PKB Kristina za kategoriju sjemena osnovno i C1 sjeme bila je potpuno uniformna. Sve trake su bile istih svojstava te se može ustanoviti da je genetska čistoća ispitivanih uzoraka iznosila 100%.



*Slika 1. Elektroforegram glijadina iz individualnih sjemeni sorte PKB Kristina, kategorije sjemena: predosnovno sjeme, osnovno sjeme i sjeme prve generacije - C1 sjeme*  
*Figure 1. Electrophoregrams of gliadin from individual seeds of variety PKB Kristina, seed categories: pre-basic seed, basic seed and seed of the first generation (certified seed)*

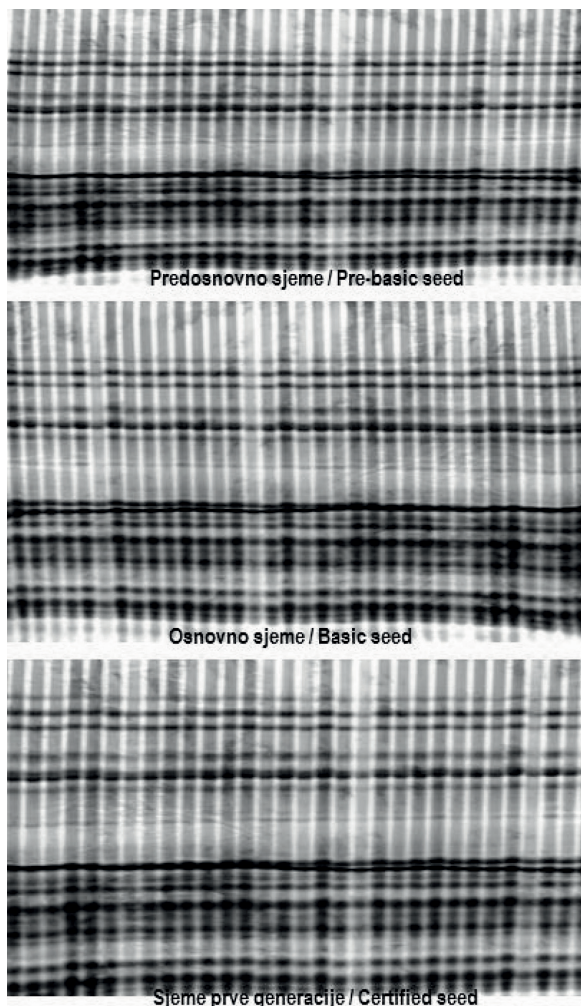
Elektroforegrami na slici 2 prikazuju glijadinske komponente-trake iz sjemena sorte PKB Merkur, u sjemenskim kategorijama: predosnovno, osnovno i C1 sjeme. Primjećuje se da postoji uniformnost i genetska čistoća od 100% za kategorije sjemena: predosnovno i osnovno sjeme, dok je za kategoriju sjemena C1 sjeme jedno zrno dalo različite trake, te genetska čistoća ove kategorije sjemena iznosi 99,0%.



Slika 2. Elektroforegram glijadina iz individualnih sjemeki sorte PKB Merkur, kategorije sjemena: predosnovno sjeme, osnovno sjeme i sjeme prve generacije - C1 sjeme  
Figure 2. Electrophoregrams of gliadin from individual seeds of variety PKB Merkur, seed categories: pre-basic seed, basic seed and seed of the first generation (certified seed)



Nakon izvršene elektroforeze i ispitivanja uzoraka sjemena sorte PKB Rodika utvrđena je genetska čistoća 100% za sve tri ispitivane kategorije sjemena, što se može vidjeti na slici 3.



*Slika 3. Elektroforegram glijadina iz individualnih sjemena sorte PKB Rodika, kategorije sjemena: predosnovno sjeme, osnovno sjeme i sjeme prve generacije - C1 sjeme*  
*Figure 3. Electrophoregrams of gliadin from individual seeds of variety PKB Rodika, seed categories: pre-basic seed, basic seed and seed of the first generation (certified seed)*



Na osnovi dobivenih rezultata, odnosno očitavanja gelova dobivenih metodom vertikalne elektroforeze utvrđeno je da postoji divergentnost između sorti po sastavu proteina, odnosno da se gelovi sorti međusobno razlikuju po karakteristikama traka, dok unutar sorti postoji ujednačenost. Dobiveni rezultati su u skladu sa rezultatima koje navodi Đurić (2013). Također, Dvořáček i sur. (2013) su metodom vertikalne gel elektroforeze ustanovili da postoje statistički značajne razlike između sorti u najvažnijim parametrima kvalitete pšenice (koje proizilaze iz glijadina i glutenina), dok između biotipova koji pripadaju istoj sorti nisu primjećene značajne razlike.

Khan i sur. (2007) su u istraživanju koristili dvije sorte pšenice s tri sjemenske kategorije gdje su ustanovili da je kategorija sjemena – predosnovno sjeme postigla značajno viši prinos kod obje ispitivane sorte, u odnosu na osnovno sjeme i sjeme prve reprodukcije koje je dalo najniži prinos zrna.

Miladinović (1964) je kod introduciranih talijanskih sorti pšenice ustanovio da razlike između sukcesivnih kategorija sjemena nisu značajne, ali su kod nekih sorti razlike između I i V kategorije značajne. Borojević (1969) je utvrdio da nema razlika u prinosu između bliskih reprodukcija sortnog sjemena, a ako ih ima da su izazvane utjecajem drugih faktora.

## ZAKLJUČAK

Na osnovi prikazanih rezultata može se zaključiti, da je primjena pozitivne i negativne selekcije na razini fenotipa pri sortnoj reprodukciji pšenice, omogućila sortnu čistoću od 99 i 100% u usjevima svih sjemenskih kategorija.

Od analiziranih sorti pšenice jedino je sorta PKB Rodika imala genetsku čistoću od 100% za sve kategorije sjemena. Sorta PKB Kristina je imala genetsku čistoću od 99% za kategoriju predosnovno sjeme, a sorta BG Merkur 99% genetske čistoće za kategoriju – sjeme prve generacije - C1.

Postoji divergentnost između ispitivanih sorti pšenice po sastavu komponenti glijadinske frakcije, odnosno gelovi sorti se međusobno razlikuju po karakteristikama traka, dok unutar sorti postoji ujednačenost.

## LITERATURA

1. Borojević, S. (1969): Genetska baza semenarstva. Savremena poljoprivreda, Novi Sad, 17(3) pp. 161-173.
2. Denčić, S., Kobiljski, B., Mladenov, N., Pržulj, N. (2009): Proizvodnja, prinosi i potrebe za pšenicom u svetu i kod nas. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 46(2) pp. 367-337.
3. Denčić, S., Malešević, M., Pržulj, N., Kondić - Špika, A. (2012): Nauka i praksa semenarstva strnih žita. Vojvođanska akademija nauka i umetnosti, Novi Sad.
4. Dong, Y.Z., Liu, Z.L., Shan, X.H., Qiu, T., He, M.Y., Liu, B. (2005): Allopolyploidy in wheat induces rapid and heritable alterations in DNA methylation patterns of cellular genes and mobile elements. *Russian Journal of Genetics*, 41, pp. 890-896.
5. Dvořáček, V., Bradova, J., Capouchova, I., Prohaskova, A., Papoušková, L. (2013): Intra-varietal polymorphism of gliadins and glutenins within wheat varieties grown in the Czech Republic and its impact on grain quality. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 49(4) pp. 140-148.
6. Đurić, N. (2013): Fenotipske promene i održanje genetičkog identiteta pri sortnoj reprodukciji pšenice. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
7. Huffman, W.E. (2004): Production, identity preservation, and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. *Plant Physiology*, 134(1) pp. 3-10.
8. Janson, J.C, ed. (2012): Protein purification: principles, high resolution methods, and applications. John Wiley & Sons, Vol. 151.
9. Jiang, G.L (2013): Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. Edited by Andersen SB. InTech, DOI: 10.5772/52583.
10. Khan, Z.A., Khan, H., Khan, R., Ghoneim, A., Ebid, A. (2007): Comparison of different wheat categories (vs) farmer's seed: yield and yield components. *Trends in Applied Sciences Research*, 2(6) pp. 529-534.
11. Kulp, K (Ed.) (2000): *Handbook of Cereal Science and Technology, Revised and Expanded*, CRC Press.
12. Lookhart, G.L., Bean, S.R., Culbertson, C. (2005): Wheat quality and wheat varietal identification. In: *Using cereal science and technology for the benefit of consumers*, Edited by Cauvarin, P.S., Salmon, S.S., Young, S.L. Proceedings of the 12th International ICC Cereal and Bread Congress 23-26th May, Harrogate, UK.

13. Menkovska, M., Knežević, D., Ivanoski, M. (2002): Protein and allelic composition, dough rheology, and baking characteristics of flour mill streams from wheat cultivars with known and varied baking qualities. *Cereal Chemistry Journal*, 79, pp. 720-725.
14. Milandinović, N. (1964): Produktivne i biološke osobine pšenice različitih semenskih reprodukcija. *Savremena poljoprivreda*, Novi Sad, 12(3) pp. 161-173.
15. Nikolić, Z. (2010): Application of genetic markers in seed testing and plant breeding. *Ratarstvo i povrtarstvo*, Field and Vegetable Crops Research, Novi Sad, 47, pp. 409-416.
16. Ruiz, M., Rodriguez-Quijano, M., Metakowsky, E. V., Vazquez, J.F., Carrillo, H. (2002): Polymorphism, variation and genetic identity of Spanish common wheat germplasm based on gliadin alleles. *Field Crops Research*, 79(2) pp. 185-196.
17. Shuaib, M., Jamal, M., Akbar, H., Khan, I., Khalid, R. (2010): Evaluation of wheat by polyacrylamide gel electrophoresis. *African Journal of Biotechnology*, 9(2) pp. 243-247.

**Adrese autora – Authors addresses:**

Dr Nenad Đurić, docent  
Tel: +381 24 712 209  
E-mail: nenad.djuric@outlook.com,

Dr Gorica Cvijanović, redovni profesor  
Tel: +381 24 712 209  
E-mail: cvijagor@yahoo.com,

M. Sc. Mirela Matković, asistent  
Tel: +381 24 712 209  
E-mail: mirelam89@gmail.com,

Dr Gordana Dozet, vanredni profesor  
Univerzitet „Džon Nežbit“, Beograd  
Fakultet za biofarming, Bačka Topola  
Maršala Tita, broj 39  
24300 Bačka Topola, Srbija  
Tel: +381 24 712 209  
E-mail: gdozet@biofarming.edu.rs

Dr Gordana Branković, docent  
Univerzitet u Beogradu, Beograd  
Poljoprivredni fakultet, Beograd  
Nemanjina, broj 6  
11080 Beograd-Zemun, Srbija  
Tel: +381 11 441 32 39  
E-mail: gbrankovic@agrif.bg.ac.rs

**Primljeno- Received:**

05.11.2015.