ZASTUPLJENOST GLIJADINSKIH LOKUSA GERMPLAZME HRVATSKE OZIME PŠENICE

Grgić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:552730

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Marija Grgić

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

ZASTUPLJENOST GLIJADINSKIH LOKUSA GERMPLAZME HRVATSKE OZIME PŠENICE

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Marija Grgić

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

ZASTUPLJENOST GLIJADINSKIH LOKUSA GERMPLAZME HRVATSKE OZIME PŠENICE

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Marija Grgić

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

ZASTUPLJENOST GLIJADINSKIH LOKUSA GERMPLAZME HRVATSKE OZIME PŠENICE

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Sonja Marić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Ivica Strelec, član

Osijek, 2015.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Glijadini 1

1.2. Glutenini 2

1.3. Cilj istraživanja 3

2. Pregled literature 4

3. Materijal i metode 11

3.1. Biljni materijal 11

3.2. Metode rada 12

3.2.1. Priprema uzoraka 12

3.2.2. SDS-PAGE elektroforeza 13

3.2.2.1. Priprema gela 14

3.2.2.2. Unošenje uzoraka i elektroforeza 15

3.2.2.3. Detekcija proteinskih vrpci nakon elektroforeze 17

3.3. Očitavanje gelova 19

4. Rezultati 21

5. Rasprava 24

6. Zaključak 27

7. Popis literature 28

8. Sažetak 32

9. Summary 33

10. Popis tablica 34

11. Popis slika 35

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic documentation card

1. UVOD

Pšenica (*Triticum aestivum* L. *spp. vulgare*) je, uz rižu i kukuruz, jedan od najznačajnijih ratarskih usjeva. Ima primjenu u prehrambenoj industriji za proizvodnju kruha i tjestenine, škroba, alkohola, ulja iz klica, glutena itd. Također se upotrebljava u konditorskoj, farmaceutskoj i pivarskoj industriji te za ishranu stoke (Martinčić i Kozumplik, 1996.). Zbog visokog stupnja polimrofizma, tj. velikog broja varijeteta i kultivara, odlikuje se širokim arealom rasprostranjenosti i uzgaja se u cjelom svijetu. Prema podacima iz 2012. godine pšenica se uzgajala na 215.489 485 ha godišnje te zauzima veću obradivu površinu od riže i kukuruza. Svjetska proizvodnja pšenice iznosila je 670 875 110 t s prosječnim prinosom od 3.113,3 kg/ha. U Republici Hrvatskoj požete površine pšenice u 2012. godini iznosile su 186 949 ha, s prosječnim prinosom od 5.347,3 kg/ha (FAOStat. 2012.).

Povećanjem broja stanovnika, raste i potreba za proizvodnjom visokorodnih pšenica koje će moći zadovoljiti svjetske potrebe za hranom. Glavni cilj oplemenjivanja pšenice, kao izrazito prehrambene poljoprivredne kulture, jest stvaranje stabilnih, visokorodnih i kvalitetnih sorata. Poboljšanje kvalitete, odnosno proteinskog sastava pšenice je vezano uz proteinski sastav zrna jer se većina važnih proteina nalazi u endospermu. Poznato je da kvaliteta brašna ovisi o sastavu i količini proteina glutena, koji ima svojstva viskoznosti i elastičnosti. Gluten sadrži dvije glavne vrste proteina, to su rezervni proteini, glijadini i glutenini (Xu i sur.,2007.). Glijadini i glutenini čine oko 80% od ukupnih proteina zrna, od čega 40% čine glijadini. Sastav rezervnih proteina, glutetnina i glijadina ima važnu ulogu u kvaliteti kruha i brašna, a vezan je i za druga svojstva pšenice (Dimitrijević i Petrović, 2008.).

1.1. Glijadini

Glijadini su uglavnom monomerni proteini s molekularnom masom (MWs) od oko 28 000 do 55 000 kDa, koji su topivi u 70-90% etanolu (Wieser, 2007.). Na temelju njihove mobilnosti u gel elektroforezi, glijadini se dijele na α, β, γ i ω glijadine. Na temelju ispitivanja aminokiselinskih sekvenci, mogu se podijeliti na različite tipove; ω5-, ω1,2-, α/β i γ-glijadine. Razlika između ovih tipova je uglavnom mala, zbog supstitucije, delecije ili adicije jedne aminokiseline (Wieser, 2007.). Tip ω-glijadina okarakteriziran je uglavnom visokim postotkom glutamina, prolina i fenilalanina, koji zajedno čine oko 80% ukupnog sastava proteina. Većini ω-glijadina nedostaje cistein, pa stoga ne postoji mogućnost unakrsnog

povezivanja disulfidnim mostovima. Topivi α/β- i γ-glijadini se značajno razlikuju od ω-glijadina i to u nekoliko aminokiselina. Jedan od primjera je aminokiselina tirozin. Svaki od ova dva tipa se razlikuje po terminalnim krajevima. N-terminalni kraj se sastoji uglavnom od ponavljajućih sekvenci bogatih glutaminom, prolinom, fenilalaninom i tirozinom, a jedinstven je za svaki tip. α/β- i γ-glijadini su znatno siromašniji glutaminom i prolinom (Wieser, 2007.). Glijadini γ- i ω- su uglavnom kodirani *Gli-1* lokusima (*Gli-A1*, *Gli-B1* i *Gli-D1*), smještenim na kratkim krajevima homolognih grupa kromosoma 1, dok su α- , β- i neki γ- glijadini kodirani *Gli-2* lokusima (*Gli-A2*, *Gli-B2* i *Gli-D2*), koji su smješteni na kratkim krajevima homolognih grupa kromosoma 6 (Salavati i sur., 2008.a). Kombinacije različitih alela na lokusima osiguravaju izvrsnu genetsku raznolikost među sortama. Postoje i manji glijadinski lokusi, *Gli*-3, *Gli*-5 i *Gli*-6 koji su kontrolirani s nekoliko manjih glijadinskih blokova te se primjerice, pomoću njih mogu razlikovati dva identična genotipa (Metakovsky i Branlard, 1998.). Glijadinski aleli na *Gli*-1 lokusima mogu poslužiti kao genetski markeri za kvalitetu tjestenine jer su usko povezani *Glu*-3 alelima (Zhang i sur., 2002.).

1.2. Glutenini

Glutenini mogu biti velike molekulske mase (HMW – High Molecular Weight) i male molekulske mase (LMW – Low Molecular Weight). Glutenini su veće molekule koje se sastoje od podjedinica povezanih disulfidnim vezama (Dimitrijević i Petrović, 2008.). HMW podjedinice su kodirane genima koji se nalaze na dugom kraku kromosoma 1A, 1B i 1D na *Glu*-A1, *Glu*-B1 i *Glu*-D1 lokusima. LMW podjedinice su kodirane genima na kratkom kraku kromosoma 1 na *Glu*-A3, *Glu*-B3 i *Glu*-D3 lokusima (Zhang i sur., 2002.). Sve sorte heksaploidne krušne pšenice imaju šest HMW podjedinica, na svakom kromosomu (1A, 1B i 1D) se nalaze po dvije podjedinice; jedna visokomolekularna podjedinica *x* tipa i jedna niskomolekularna *y* tipa (Shewry i sur., 2001.).

Kvaliteta kruha u velikoj mjeri ovisi o broju i sastavu HMW gluteninskih podjedinica, odnosno utječu na čvrstoću i elastičnost tijesta (Horvat i sur., 2006.). Prema Zhang i sur. (2002.) aleli *Glu*-A1b (Ax2*) i *Glu*-D1d (Dx5 + Dy10) su povezani s vrhunskom kvalitetom tijesta.

HMW gluteninske podjedinice čine približno 10% glutena, dok LMW nešto više, približno 20% (Wieser, 2007.)

1.3. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati i utvrditi zastupljenost glijadinskih lokusa u dvadeset hrvatskih sorata ozime pšenice.

2. PREGLED LITERATURE

Rukavina i sur. (2012.) su analizirali kompozicije glijadinskih lokusa hrvatske germplazme heksaploidne pšenice. Analizirano je 50 sorti heksaploidne ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.). Identifikacija kompozicije ω-glijadina je provedena poliakrilamid gel elektroforezom u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) prema BSA priručniku. Na ω-glijadinskom lokusu *Gli-B1* utvrđena je najčešća kombinacija podjedinica 63+67 s učestalošću od 64% u 32 sorte. Podjedinica 66 ima učestalost od 16% u osam sorata dok je nulti alel (N) imao učestalost od 14% utvrđen u 7 sorti. Podjedinica 60 je identificirana u dvije sorte s učestalosti od 4% dok je podjedinica 61 (2%) utvrđena u samo jedne sorte. Na lokusu *Gli-D1* najzastupljenija podjedinica je bila 55 koja ima učestalost 94% (47 sorata). Utvrđene su i podjedinice 59 (4%) i 55+56+59 (2%). Broj alela po lokusu kretao se od 3 (*Gli-D1*) do 7 (*Gli-B1*). Na *Gli-B1* lokusu je utvrđena veća genetska različitost, dok je na *Gli-D1* znatno manja različitost. Kombinacije podjedinica sa visokom frekvencijom mogu biti rezultat direktne selekcije na poželjna genetska, morfološka i fiziološka svojstva.

Žilić i sur. (2011.) su iz četiri krušne (*T. aestivum* L.) i četiri durum (*T. durum* Desf.) pšenice analizirali sastav proteina glijadina i glutenina, te sadržaj triptofana i vlažnog glutena. Analiza se provodila pomoću SDS-PAGE elektroforeze. Omjer glijadina i glutenina među krušnim i durum genotipovima je varirao od 0,49 do 1,01 i od 0,57 do 1,06. U odnosu na durum pšenicu, genotipovi krušne pšenice su imali veću koncentraciju α-, β- i γ- glijadina, što je u prosjeku 61,54 % izoliranih proteina. U krušnoj i durum pšenici je uočena niska koncentracija ω- glijadina. U krušnoj je udio ω- glijadina iznosio od 0,50% do 2,53% , dok je u durum iznosio od 3,65% do 6,99%. U odnosu na krušnu, durum pšenica je sadržavala visok postotak triptofana i vlažnog glutena.

Metakovsky i sur. (1984.) su istraživali sastav glijadina i njegovo nasljeđivanje pomoću dvodimezionalne gel – elektroforeze (s aluminij-laktat puferom) i SDS – elektroforeze. Pomoću SDS – elektroforeze postigla se dobra razlučivost, te se mogla približno determinirati molekulska masa proteina. Za istraživanje je korišteno devet sorti ozime pšenice *Triticum aestivum*(Bezostaya 1, Mironovskaya Yubileinaya, Rusalka, Dneprovskaya 521, Zaporozhskaya Ostistaya, Koncho, Kavkaz, Promin, Odesskaya 16). Otkrivene su 24 i 41 komponenta u Bezostayi 1, 26 i 45 komponenti u Kavkazu i Rusalki

Đukić i sur. (2005.) ispitivali su glijadine u 21 kultivaru durum pšenice pomoću vertikalne gel-elektroforeze, pri pH 3,1 (A-PAGE, Acidic PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Dobiveni elektroforegrami su različiti za svaku od analiziranih sorata durum pšenice. Elektroforegram jedne sorte je uspoređivan s elektroforegramima ostalih 20 sorata. Broj glijadinskih komponenti je varirao od 18 do 28 među sortama. Različit broj komponenti, njihove relativne mobilnosti i intenzitet boje se može koristiti za procjenu razlike među sortama. Različita podrijetla kultivara, promjene u rekombinaciji i mutacije gena mogu biti razlog visokog polimorfizma glijadinskih lokusa. Elektroforegrami se također mogu koristiti za utvrđivanje sličnosti među sortama po glijadinskom sastavu. Prema relativnoj mobilnosti došlo se do zaključka da su sorte YG 7160 i YG 7164 vrlo slične (61,53%), te su dosta različite u odnosu na sortu YG 4541.

Knežević i sur. (2007.a) su istraživali sastav glijadina koji su kontrolirani *Gli – D1*alelima u 25 sorti ozime pšenice. Korištena je A-PAGE metoda elektroforeze. Dobiveni elektroforegrami su korišteni za utvrđivanje varijabilnosti glijadinskih komponenti i identifikaciju glijadinskih blokova. Kodirano je pet različitih alela na *Gli – D1* lokusu. Glijadinski blokovi su se razlikovali prema broju komponenti i molekulskim masama. Dokazana varijabilnost je ukazala na postojanje polimorfizma glijadinskih alela *Gli – D1* lokusa. Frekvencija alela je bila različita i to u rasponu od 4% do 52% . Najveću učestalost je imao *b* alel, a najmanju *g* alel.

Dimitrijević i Petrović (2008.) su istraživali genetičke varijabilnosti lokusa *Glu-A1, Glu-B1 i Glu-D1* genoma heksaploidne pšenice. Sastav podjedinica glutenina velike molekulske mase stavili su u odnos sa reološkim svojstvima tijesta, a praćena je i alelna varijabilnost tih lokusa kao posljedica selekcijskog pritiska u programu oplemenjivanja. Za ispitivanje je odabrano 133 sorti pšenice (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*), a analiza se provodila pomoću SDS PAGE elektroforeze. Alelana varijabilnost na *Glu-A1* lokusu kromosoma A1 sadržavala je N, 1 i 2* alele. Na *Glu-B1* lokusu kromosoma 1B najzastupljenije kombinacije podjedinica su bile 7+9, 7+8, 7 i 6+8, dok su na *Glu-D1* lokusu kromosoma D1 uočene samo dvije kombinacije podjedinica, 2+12 i 5+10. Učinak varijabilnosti alela na *Glu-A1* lokusu zapažen je na reološkim svojstvima tijesta, a potvrđeno je da varijabilnost na tom lokusu ima najmanji značaj u formiranju kvalitete. Alelna varijabilnost na lokusu *Glu-D1* je imala najveći utjecaj na fenotipsku varijabilnost pojedinih svojstava (najveću prednost imale su kombinacije podjedinica 5+10). Na temelju ovog istraživanja zaključili su da varijabilnost istraživanih gluteninskih alela upućuju na oplemenjivanje na kvalitetu, te da pojedine kombinacije

podjedinica mogu poslužiti kao orijentacijski fenotipski markeri u selekciji poželjnih genotipova u ranim generacijama u procesu oplemenjivanja.

Na temelju glijadina, Aguiriano i sur. (2006.) su ispitivali genetičku varijabilnost durum pšenice španjolskih, portugalskih, američkih i talijanskih sorata koje su sačuvane u gen banci „Plant Genetic Resources Centre“ (CRF-INIA). Od ukupno 38 različitih alela identificirani su lokusi *Gli-A1, Gli-A3, Gli-B5, Gli-B1, Gli-A2* i *Gli-B2.* Svi glijadinski lokusi su polimorfni, velikom genetskom raznolikosti, gdje *Gli-A2* i *Gli-B2* lokusi imaju najveći polimorfizam. Na *Gli-A2* lokusu je iznosila 8,987, dok je na *Gli-B2* lokusu 5,192 alela. Lokus *Gli-A2* je imao najveću učestalost alela, veću od 30%. Lokusi *Gli-B1* i *Gli-B2* predstavljaju izvor velikog broja novih alela. Novi aleli, *Gli-A1new2*, *Gli-B1new3*i *Gli-B2new6*su unikatni i nalaze se samo u jednom zrnu. Najmanju varijabilnost predstavlja *Gli-B1* lokus, on je kodiran glijadinom γ-45, što upućuje na dobru kvalitetu. Svi glijadinski lokusi predstavljaju veliku genetsku raznoslikost, male genetske varijacije unutar vrsta te velike razlike između populacija. Lokus *Gli-A2* pokazuje najveću genetsku raznolikost unutar vrste, dok *Gli-B1* pokazuje najmanju genetsku raznolikost između vrste.

Knežević i sur. (2007.b) su A-PAGE metodom ispitivali kompoziciju glijadina i *Gli-A1* lokusa na 25 kultivara pšenice. Analiza je pokazala razlike među kultivarima. Istraživanje je bilo usmjereno na polimorfizam *Gli-A1* lokusa koji se nalazi na kratkom kraku 1A kromosoma. Alelna varijabilnost utvrđena je na *Gli-A1* lokusu, gdje su utvrđena četiri različita alela (a, b, c, f). Ukupno 10 od 25 kultivara je imalo *Gli-A1a* alele (40% učestalosti), 7 *Gli-A1b* alele (28% učestalosti), 1 nosi *Gli-A1c*(4% učestalosti)i 7 *Gli-A1f* alele (28% učestalosti). Svaki od ovih alela ima specifičnu vezu sa biološkim svojstvima pšenice te se mogu koristiti kao markeri za kvalitativna svojstva, agronomska svojstva i ekološku adaptaciju. U ispitivanim kultivarima pšenice, glijadinski blokovi uključuju od dvije do četiri različite komponente. Blok kodiran alelima *a* i *c* sastoji se od dvije proteinske vrpce, jedna čini γ- , a druga β- regiju. Glijadinski blokovi kodirani *Gli-A1b* alelom također imaju dvije regije. Za blokove kodirane *Gli-A1f* karakteristične su tri regije; ω, γ i β.

Kozub i sur. (2009.) su ispitali varijabilnost i identificirali glijadinske lokuse *Gli-A1, Gli-B1* i *Gli-D1*, te visokomolekularne gluteninske podjedinice *Glu-A1, Glu-B1* i *Glu-D1* u 77 sorata ozime pšenice*T. aestivum* L. koje su uzgajane na području Ukrajine u različitim vremenskim periodima (1996.-2007.). Analiza se provodila A-PAGE metodom. *Gli-A1* lokus je imao najveći broj alela (8), dok su *Gli-B1* i *Gli-D1* lokusi imali po sedam. Gluteninske podjedinice

su imale nešto manje alela; *Glu-B1* je imao pet alela, dok su *Glu-A1* i *Glu-D1* imali po tri alela. Identificirana su 4 glijadinska alela i to *Gli-A1w, Gli-A1x, Gli-A1y* i *Gli-B1x.Gli-A1w* je pronađen u šest kultivara. Pretpostavlja se da je *Gli-A1y* nastao rekombinacijom alela *Gli-A1b* i *Gli-A1f.* Uspoređujući kultivare koji su se uzgajali u različitim vremenskim periodima, uočena je pojava novih alela i promjene učestalosti kod već postojećih. U razdoblju od 1996. do 2007. godine, većina alela je imala visoke frekvencije *Gli-A1f*, *b* i *l* na *Gli-B1*, *Gli-D1b*, *a* i *b* na *Glu-A1*, *Glu-B1c* i *Glu-D1d*. Među *Gli-1* lokusima, najveći indeks varijacije pokazuju *Gli-A1* lokusi.

Salavati i sur. (2008.a) su pomoću A-PAGE metode analizirali glijadine u 73 iranske sorte pšenice (landrace[1]). Analizom je uočen izrazit polimorfizam. Rezultati su pokazali veliku varijabilnost glijadina koji su kodirani sa šest glavnih lokusa. Izračunat je indeks genetičke varijabilnosti (H) za svaki lokus. Lokus *Gli-2* je pokazao mnogo veću genetičku raznolikost (0.820) u odnosu na *Gli-1* lokus (0.631). Za lokus *Gli-A1* (osam alela) genetska varijabilnost je iznosila 0.794 H vrijednost, za *Gli-B1* lokus (osam alela) iznosila je 0.663, za *Gli-D1* (šest alela) iznosi 0.436, za *Gli-A2* (11 alela) iznosi 0.825, za *Gli-B2* (10 alela) iznosi 0.816, i za *Gli-D2* lokus (devet alela) iznosi 0.820. Također je uočeno da je raspodjela alela u glijadinskim lokusima neujednačena, primjerice *Gli-D1* lokus nosi 6 alela, dok *Gli-A2* nosi 11 alela. Sorte koje rastu u hladnijim predjelima imaju veću učestalost alela *g* (primjerice *Gli-D2g*) u odnosu na one sorte koje se uzgajaju u toplijim krajevima. Alel *Gli-D2g* također pridonosi velikoj otpornosti na hladnoću. Ostali glijadinski aleli koji pridonose otpornosti na zimu su *Gli-A2r, Gli-A1a, Gli-B2c*i *Gli-D2m.*

Zaefizadeh i sur. (2010.) su ispitivali ukupno 50 sorti durum pšenice sa područja sjeverozapadnog Irana i Azerbejdžana. Korištena je A-PAGE metoda. Cilj ovog ispitivanja je bio identificirati glijadine i genetsku raznolikost durum pšenice. Elektroforezom je dobiveno 66 različitih proteinskih vrpci. Identificirana je 81 različita glijadinska vrpca,od kojih 22 pripadaju skupini ω-glijadina, 20 pripada γ-glijadinima, 19 pripada β-glijadinima i 20 α-glijadinima. Budući da su α- i β- glijadini kontrolirani genima koji su prisutni u 6 homolognih grupa, postoji mogućnost manjeg polimorfizma u odnosu na γ- i ω- glijadine koji su prisutni u samo jednoj homolognoj grupi. Tanaka i sur. (2003.) su također potvrdili veće varijacije u γ- i ω- glijadinima nego u α- i β- glijadinima japanskih sorti. Većina γ- i ω- glijadina se nalaze na

[1] Sorta na koju nisu primjenjivani suvremeni postupci hibridizacije. Može biti lokalna sorta ili divlja sorta koja je na nekom području uzgajana dvadesteak godina koja je križana s nekim novijim ili drugim landrace sortama. Također, nosi gene za otpornost na bolesti (mrežni izvor: https://vutra.org/threads/landrace.819/).

Gli-1 lokusima, dok se α- i β- glijadini nalaze većinom na *Gli-2* lokusima. Indeks genetičke raznolikosti je bio veći za α glijadine (H=0,924), dok je za ω- iznosio 0.899, za γ- 0,878, a za β je iznosio 0,866. iranske sorte su imale više genetske raznolikosti od azerbejdžanskih.

Waga i sur. (2013.) su analizirali učinke spontanih mutacija na tri glijadinska lokusa (*Gli-D1, Gli-B1 i Gli-B2*) prilikom čega su istražili može li nulti alel u nekim glijadinskim lokusima smanjiti alergijska svojstva. Za ispitivanje su koristili A-PAGE (Acidic PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatogram) i ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metode. Na temelju dobivenog elekroforegrama, populaciju su podijelili na dva tipa: GDL (Gliadin Deletion Lines) koji sadrži nulte alele i CL (Control Lines). Alergena svojstva su ispitivali ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) metodom na pet pacijenata koji su alergični na gluten. Procijenjena imunoreaktivnost GDL-a je 6,14%-18,02% niža u odnosu na CL. Na temelju rezultata utvrdili su da nulti alel glijadina može smanjiti alergena svojstva.

Van Lonkhuijsen i sur. (1992.) su ispitivali kakav utjecaj imaju pojedini glijadini na kvalitetu kruha. Analizirali su 164 uzorka pšenice. Ispitivanje se provodilo pomoću RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatogram) metode i A-PAGE metode. RP-HPLC je metoda razdvajanja proteina na temelju hidrofobnosti, dok je A-PAGE metoda razdvajanja proteina na osnovi njihove molekulske mase i naboja. Korištenjem RP-HPLC metode za odvajanje glijadina zabilježene su velike varijacije među vrstama, odnosno u kromatogramima. Hidrofilnu skupinu glijadina čine ω-glijadini, dok hidrofobnu čine α i β-glijadini. Najhidrofobniju skupinu (61-75) čine γ-glijadini. Na temelju visokomolekularnih glutenina-A, 32 uzorka sadrže 7 i 2+12 podjedinice. Unatoč tome što imaju identičnu kompoziciju, ove vrste pšenice razlikuju se urazličitom volumenu peciva. Volumen peciva je varirao između 4,450 i 6,160 ml/kgbrašna. Poznato je da se povećanjem udjela proteina povećava i volumen kruha, no u ovom slučaju ne postoji veza između sadržaja proteina i volumena. Analiza je pokazala dobru korelaciju između volumena kruha i kompozicije γ-glijadina. Utvrđeno je da kvaliteta i kompozicija proteina imaju puno veću važnost za kvalitetu kruha nego sadržaj proteina.

Daniel i Triboi (2000.) su ispitivali kako temperatura i gnojidba dušikom utječu na težinu zrna pšenice i na sadržaj proteina, posebno glijadina. Ispitivanje je provedeno metodom sekvencionalne ekstrakcije i RP-HPLC metodom. Testiranje je provedeno u poljskim pokusima u razdoblju 1994.,1995. i 1997. godine. Uočeno je da s povećanjem temperature i

povećanom opskrbom dušika, raste i postotak proteina glijadina u brašnu. Udio ω-glijadina je povećan s povećanjem temperature i dušika. Udio α- i β-glijadina se povećava temperaturom, a smanjuje dušikom, dok se udio γ-glijadina smanjuje temperaturom, a povećava dušikom.

Zillman i Bushuk (1979.) su identificirali pšenične kultivare pomoću glijadinskog elektroforegrama, i ispitali utjecaj okolišnih faktora na elektroforegram. Ispitivanje je provedeno na pet kanadskih sorata koje su uzgajane na 10 lokacija u Manitobi i Saskatchewan-u, te na pet australskih sorti koje su uzgajane u Australiji i Kanadi. Testirano je šest uzoraka kanadske crvene jare pšenice, Neepawa, uzgajane na šest različitih načina gnojidbe, sa sadržajem proteina 9,3 – 16,4%, te je utvrđeno da sadržaj proteina i područje uzgoja pšenice ne utječe na elektroforegram. Također su ispitivali kako priprema uzorka zrna, metoda ekstrakcije glijadina i metoda bojenja utječe na elektroforegram. Utvrđeno je da je ekstrakcija glijadina s neučinkovitim otapalima jedini faktor koji je uzrokovao kvalitativna odstupanja u elektroforegramu. Ako se koriste odgovarajuće otopine pri izolaciji glijadina i odgovarajući uvijeti čuvanja uzoraka, elektroforegram je vrlo pouzdan pri identifikaciji sorata.

Metakovsky i sur. (2000.) su identificirali glijadinske alele u 100 sorata pšenice koje su uzgajane na području Španjolske u posljednjih 40 godina. Uočen je visok stupanj genetskog polimorfizma. Uključujući nulti alel, pronađeno je ukupno 103 alela u šest glavnih glijadinskih lokusa. Pretpostavlja se da je velika genetska raznolikost nastala zbog pojavljivanja nekih primitivnih lokalnih sorti. Također, visok stupanj genetskog polimorfizma je održavan uvođenjem germplazme iz različitih izvora. Identificirano je 13 novih glijadinskih alela, uključujući *Gli-D2w* koji je kodiran *Gli-D2* lokusom.

U 52 vrste španjolske pšenice (*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*), Ruiz i sur. (2002.) su ispitivali genetski polimorfizam, varijacije i identitet. Proučavane su promjene koje su se događale tijekom 35 godina (razdoblje prije i poslije 1966. godine). Na *Gli-A1* lokusu je identificirano 11 alela, na *Gli-B1* je identificirano 14, na *Gli-D1* je ustanovljeno devet alela, dok *Gli-A2* nosi 17, *Gli-B2* nosi 14 i *Gli-D2* nosi 16 alela. Kod ovih skupina je ustanovljena najveća varijabilnost. Tijekom 35 godina, utvrđeno je da je došlo do promjene glijadinskih alela, uglavnom zbog načina uzgoja i uvođenjem strane germplazme u procesima oplemenjivanja. Analiza je pokazala da je germplazma španjolskih sorti vrlo polimorfna i jedinstvena. Glijadinski polimorfizam je vrlo važan iz razloga što glijadini služe kao genetički markeri pri identifikaciji genotipova u gen-bankama.

Qi i sur. (2009.) su izolirali iz pšenice 170 γ – glijadina, među kojima je 138 sekvenci funkcionalno. ORF (Open Reading Frame) duljina tih sekvenci je u rasponu od 678 bp do 1089 bp. Analizom je uočeno da su γ – glijadini dosta različiti. Uspoređujući *Gli – 1* lokuse *Sitopsis*i *Aestivum tauchii* diploidnim pšenicama, filogenetskom analizom je uočeno da ne postoji znatna razlika. Sastav aminokiselina je pokazao da postoji širok spektar esencijalnih aminokiselina u γ – glijadinima. Došlo se do zaključka su γ – glijadini u pšenicama vrste *Aegilops* raznovrsni, da svaka skupina ili podskupina doprinosi različitim prehrambenim kvalitetama.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

U istraživanje je uključeno 20 sorata heksaploidne krušne pšenice (*Triticum aestivum* L. *spp. vulgare*) hrvatskog podrijetla i pet sorti stranog podrijetla (Italija, Rusija i Francuska). Sorte su odabrane na temelju godine priznavanja, zastupljenosti u proizvodnji i području uzgoja (tablica 1). U istraživanje je uključeno i šest sorata koje su poslužile kao standardi pri identifikaciji glijadinskih lokusa (tablica 2).

Tablica 1. Godina priznavanja, podrijetlo i pedigre sorata ozime pšenice

Br.	Sorta	God.	Podrijetlo	Pedigre
1.	U1	1936.	PIO	Carlotta Strampeli/Marquis
2.	Sirban Prolifik	1905.	Bohutinsky	-
3.	Zlatna Dolina	1971.	Bc institut	Zg 414-57/Leonardo
4.	Perla	1997.	AG	-
5.	BC Patria	1994.	Bc institut	Odesskaya-51/Zg-IPK-8210/2/ GK-32-82
6.	Fiesta	1998.	AG	By 87-83/Osk.3.68/2-85
7.	Gabi	1999	AG	Srpanjka/GK 32-82
8.	Kalista	2005.	AG	Divana/Soissons
9.	Matea	2005.	AG	Soissons/Perla
10.	AFZG Karla	2010.	AGRZG	SVK/VID/OBR
11.	Sana	1983.	AGRZG	Mura/Cl 14123/Bc-2413/72
12.	Mihelca	1996.	Bc institut	ZG 1325/78/SO-1065
13.	Aura	1997.	Bc institut	434 K-4CM/7903-93-1
14.	Cerera	1993.	Jošt	NE-7060-76-Y-342/VG-19
15.	Divana	1995.	Jošt	Favorit/5/Cirpiz/4/J.Kwang/2/Atlas66/Coma c./3/Velvet
16.	Žitarka	1985.	PIO	Osk. 6.30-20/Slavonka/3/Eph. M68/Osk.154 -19/Kavkaz
17.	Srpanjka	1989.	PIO	Osk. 4.50-1-77/Zg 2696
18.	Golubica	1998.	PIO	Slavonija/Gemini
19.	Aida	2006.	PIO	Srpanjka/Rialto
20.	Ilirija	2008.	PIO	Osk.-14-294-16-95/Soissons

21.	Libellula	1965.	Italija	Tevere/Giuliari//San Pastore
22.	Avrora	1972.	Rusija	Lutescens-314-h-147/Bezostaya 1
23.	Kavkaz	1972	Rusija	Lutescens-314-h-147/Bezostaya 1
24.	Bezostaja	1963.	Bivši SSSR	Skorospelka 2/Lutescens 17
25.	Renan	1991.	Francuska	Mironovs.808/M.Hunstm./3/VPM/Moisson 1.5//Courtot

Tablica 2. Godina priznavanja, podrijetlo i pedigre sorti standarda

Br.	**Sorta**	**God.**	**Podrijetlo**	**Pedigre**
1.	Kanzler	1980.	Njemačka	Caribo/Heinrich;Heinrich/Caribo;Caribo//Carstacht/Firlbeck-II/3/Felix
2.	Ritmo	1990.	Nizozemska	Hobbit/Line-1320//Wizard,Gbr/3/Marksman/Virtue;Hobbit//Line-1320/Wizard.Gbr/3/Marksman/4/Virtue
3.	Alidos	1987.	Njemačka	Arkos/Hadmerslebener-00914-76
4.	Herzog	1986.	Njemačka	Weihenstephaner-616-67//Kormoran/Kronjuwel
5.	Troll	1967.	Švedska	Ring//Pondus/Karn
6.	Carolus	1985.	Njemačka	Cama//Diplomat/Perseus

3.2. Metode rada

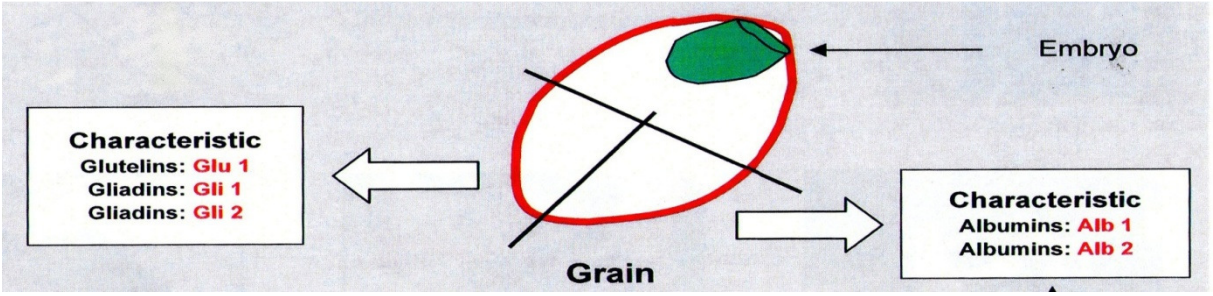
Zastupljenost glijadinskih lokusa utvrđena je pomoću poliakrilamid gel elektroforeze u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) BSA vodiču za elektroforezu pšenice. Ispitivanje je provedeno u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju Poljoprivrednog fakulteta i u Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku.

3.2.1. Priprema uzoraka

Uzorci su pripremljeni na način da je svako zrno podijeljeno na tri dijela. Jedan dio svakog zrna iz kojeg je moguća izolacija glijadina i glutenina je odvajan u pločicu s jažicama (slika

1). Sveukupno je bilo devet pločica. U svaku jažicu je dodan ekstrakcijski pufer za izolaciju glijadina (sastav prikazan u tablici 3), nakon čega je uslijedila inkubacija u hladnjaku na 6°C preko noći. Po isteku vremena ekstrakcije glijadina u jažice je dodan ekstrakcijski pufer za izolaciju glutenina (sastav prikazan u tablici 3). Nakon toga je uslijedila inkubacija u hladnjaku preko noći na 6°C.

Ekstrahirani glijadini i glutetnini razdvajani su pomoću SDS-PAGE.



Slika 1. Prikaz dijela pšenice iz kojeg je moguća izolacija glijadina i glutenina (izvor: BSA vodič za elektroforezu pšenice)

3.2.2. SDS-PAGE elektroforeza

Pojam elektroforeza označava gibanje čestica u električnom polju, a njihova pokretljivost ovisi o jakosti električnog polja, neto naboju, veličini i obliku proteinskih molekula, ionskoj jakosti pufera za elektroforezu i temperaturi razdjeljivanja. SDS-PAGE metoda je danas najšire korištena elektroforetska tehnika za analizu i razdvajanje proteina, zahvaljujući sposobnosti SDS-a da, u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih veza, denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance. Za razdvajanje glijadina korištena je navedena metoda prema BSA vodiču za elektroforezu pšenice.

Korišten je sustav za vertikalnu elektroforezu – Amersham Biosciences, SE 600 Ruby® kojom je moguće provesti razdjeljivanje proteina u dva gela istovremeno. Sustav se sastoji od donje puferske komore, izmjenjivača topline s ugrađenom elektrodom (anodom), gornje puferske komore s ugrađenom elektrodom (katodom) i zaštitnog poklopca.

3.2.2.1. Priprema gela

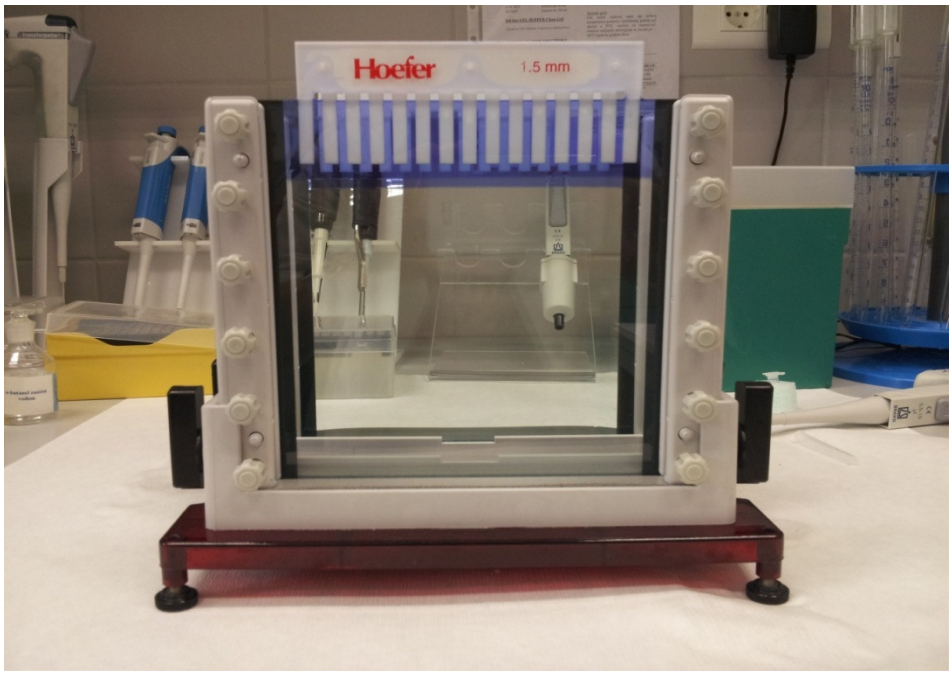
Poliakrilamidni gel se izlijeva koristeći ploče za lijevanje gela dimenzija 18x16 cm. Proces izlijevanja gela provodi se u dvije faze. Prvo se nalijeva gel za razdvajanje, a potom gel za sabijanje. Za lijevanje gelova pripremljene su sljedeće otopine:

1. Osnovna otopina akrilamida
2. Pufer za pripremu razdvajajućeg gela (4x koncentrirani)
3. Pufer za pripremu sabijajućeg gela (4x koncentrirani)
4. 10% - tna otopina natrijeva dodecil-sulfata (SDS)
5. 10% - tna otopina amonijeva persulfata (APS)
6. Pufer za ispiranje površine razdvajajućeg gela
7. Pufer za elektroforetsko razdijeljivanje (10x koncentrirani)
8. *n*-butanol zasićen vodom

Sastav otopina naveden je u tablici 4.

Nakon pripreme potrebnih otopina uslijedila je priprema polimerizacijske otopine razdvajajućeg gela. U čašu od 100 ml dodana je prethodno pripremljena osnovna otopina akrilamida (20 ml), pufera za pripremu razdvajajućeg gela (15 ml), 10% SDS (0,6 ml), deionizirana voda (24,2 ml), 10% APS (0,3 ml) i TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) 0,02 ml. Smjesa je promiješana i između dviju staklenih ploča, pipetom je pažljivo izliven pripremljeni 10%-tni razdvajajući gel. Polimerizacijska smjesa je nadslojena sa n-butanolom kako bi se eliminirali mjehurići s površine. Polimerizacija je trajala 45 minuta. Nakon polimerizacije površina gela je tri puta isprana puferom za ispiranje površine razdvajajućeg gela. Na ovako ispranu površinu razdvajajućeg gela je naliven sabijajući gel.

Za pripremu sabijajućeg gela u čašu je dodana pripremljena osnovna otopina akrilamida (1,34 ml), pufer za pripremu sabijajućeg gela (2,5 ml), 10% SDS (0,1 ml), deionizirana voda (6 ml), 1% otopina boje bromfenol plavo (Bromphenol blue) 0,01 ml, 10% APS (0,05 ml) i TEMED (0,005 ml). Prije izlijevanja smjese na gornji dio oba stakla postavljen je „češalj“ s 15 jažica (slika 2). Smjesa je pažljivo izlivena pipetom. Polimerizacija je trajala 45 minuta. Nakon polimerizacije češljevi su pažljivo izvučeni kako se nebi oštetio gel. Površina gela je dva puta isprana s prethodno pripremljenim puferom za elektroforetsko razdvajanje. Nakon dva ispiranja u svakoj jažici je ostavljen pufer.



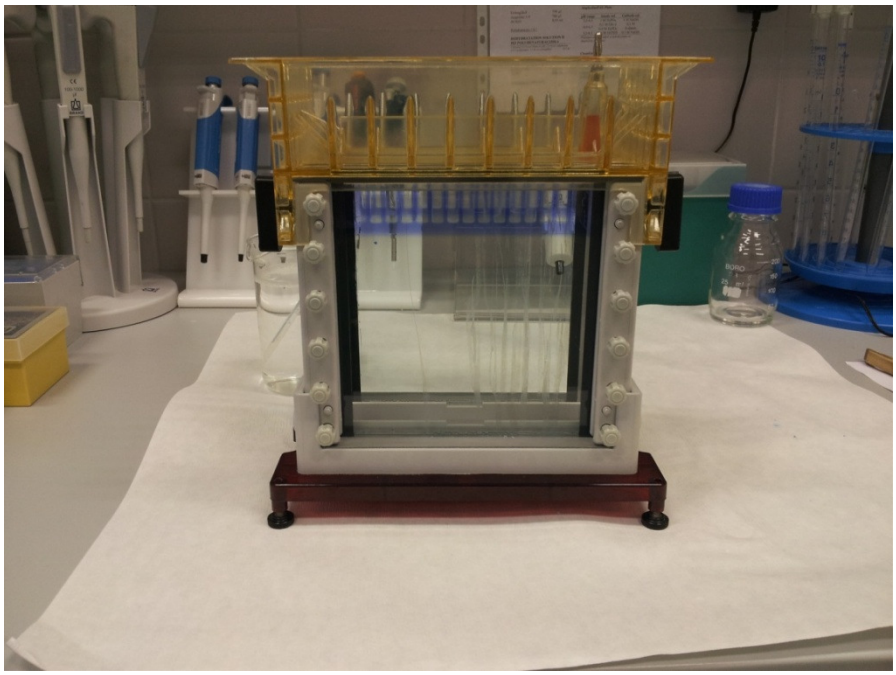
Slika 2. Sustav za lijevanje gelova (foto original; M. Grgić)

3.2.2.2. Unošenje uzoraka i elektroforeza

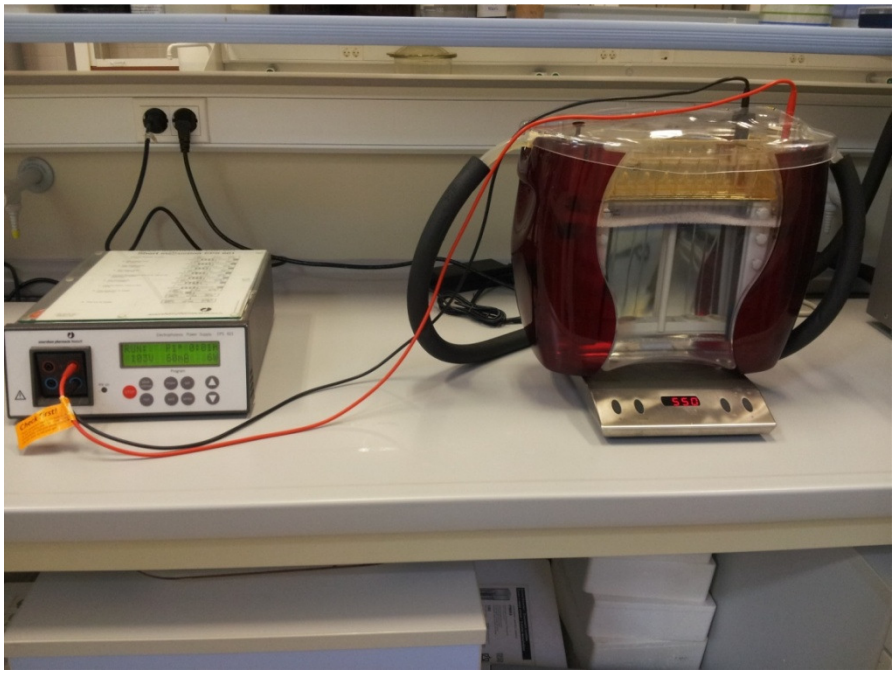
Nakon što su pripremljeni gelovi, u svaku jažicu su mikropipetom naneseni uzorci. U 1. i 15. jažicu je nanešeno po 10 µl standarda proteina visoke molekularne mase (HMW) koji su poslužili pri identifikaciji glijadinskih lokusa. Standardi HMW proteina pripremljeni su prema uputama proizvođača (TaKaRa Bio Inc.).

U ostale jažice su naizmjenično naneseni uzorci proteina standardnih sorata i uzorci proteina sorata hrvatskog i stranog podrijetla.

Nakon nanošenja uzoraka u jažice gela, na gornji dio stakala je pričvršćena gornja puferska komora u koju je pažljivo dodan pufer za elektroforezu (slika 3). Potom je sustav prebačen u donju pufersku komoru ispunjenu puferom za elektroforezu, te je provedeno spajanje elektroda sa izvorom struje i pokrenut postupak elektroforeze. Elektroforeza se provodila 4.30 sata pri konstantnoj jakosti struje od 60 mA i naponu od 600 V, uz konstantno održavanje temperature pri 15°C pomoću termostatskog cirkulatora i miješanje pufera u donjoj puferskoj komori elektromagnetskom miješalicom (slika 4).



Slika 3. Prikaz gornje puferske komore pričvršćene na staklima (foto original; M. Grgić)



Slika 4. Postupak elektroforeze na uređaju SE 600 Ruby® (foto original; M. Grgić)

3.2.2.3. Detekcija proteinskih vrpci nakon elektroforeze

Po isteku elektroforeze gelovi su pažljivo odvajani od stakala, potom uronjeni u 12,5% otopinu trikloroctene kiseline u svrhu fiksiranja proteina u gelu. Nakon 45 minuta fiksiranja proteina u gelu, otopina je odlivena i na gelove je dodana otopina za bojanje proteina. Otopina za bojanje proteina pripremljena je neposredno pred bojanje miješanjem 200 ml koloidne otopine boje (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 2% *o*-fosforna kiselina, 6% amonijev sulfat) i 50 ml metanola (Strelec, 2007.).

Bojanje proteina provedeno je tijekom noći uz blago miješanje na tresilici (slika 5), nakon čega je uslijedilo odbojavanje. Višak boje uklonjen je ispiranjem gela 3 minute u 100 mM Tris-fosfatnom puferu pH 6,5, a potom 1 minutu u 25% metanolu.



Slika 5. Bojanje gelova (foto original; M. Grgić)

Stabilizacija kompleksa protein:boja provedena je uranjanjem gela u 20% otopinu amonijeva sulfata tijekom 24 sata. Gelovi su potom ispirani u destiliranoj vodi 4 x 5 minuta, i nakon toga impregnirani u 2% otopini glicerola tijekom 60 minuta. Nakon impregnacije gelovi su uslikani u „G-BOX“ uređaju radi lakšeg očitavanja rezultata i trajne pohrane podataka.

U svakom postupku elektroforeze provedena su ispitivanja na dva gela istovremeno. Provedene su dvije elektroforeze, odnosno analizirana su četiri gela.

Tablica 3. Ekstrakcijske otopine za izolaciju glijadina i glutenina

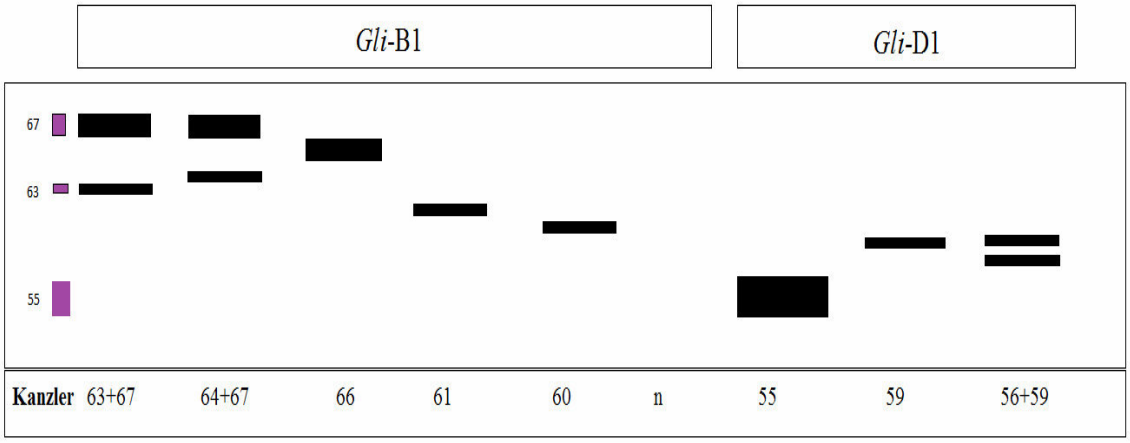
Br.	Otopina	Kemikalije	Količina
1.	Pufer za ekstrakciju/izolaciju glijadina	Ethylenglycole Urea CHAPS dd H_2O	30 mL 36 g 2 g do 100 mL
2.	Pufer za ekstrakciju/izolaciju glutenina	Urea β-Mercaptoethanol SDS dd H_2O	2,7 g 0,3 mL 1,5 g do 10 mL

Tablica 4. Otopine za pripremu gelova i elektroforezu

Br.	Otopina	Kemikalije	Količina
1.	Osnovna otopina akrilamida	Akrilamid *bis*-akrilamid dd H_2O	60 g 1,6 g do 200 mL
2.	Pufer za pripremu razdvajajućeg gela (4x koncentrirani)	Tris 4NHCl dd H_2O	36.3 g 8,8 pH do 200 mL
3.	Pufer za pripremu sabijajućeg gela (4x koncentrirani)	Tris 4NHCl dd H_2O	3,0 g 6,8 pH do 50 mL
4.	10% otopina natrijeva dodecil-sulfata (SDS)	SDS dd H_2O	10,0 g do 100 mL
5.	10% otopina amonijeva persulfata (APS)	APS dd H_2O	0,1 g do 1 mL
6.	Pufer za ispiranje površine razdvajajućeg gela	4x resolving gel pufer 10% SDS dd H_2O	25 mL 1,0 mL do 100 mL
7.	Pufer za elektroforetsko razdjeljivanje (10x koncentrirani)	Tris Glicin SDS dd H_2O	30,28 g 144,13 g 10,0 g do1000 mL
8.	*n*-butanol zasićen vodom	n-butanol dd H_2O	50 mL 5 mL

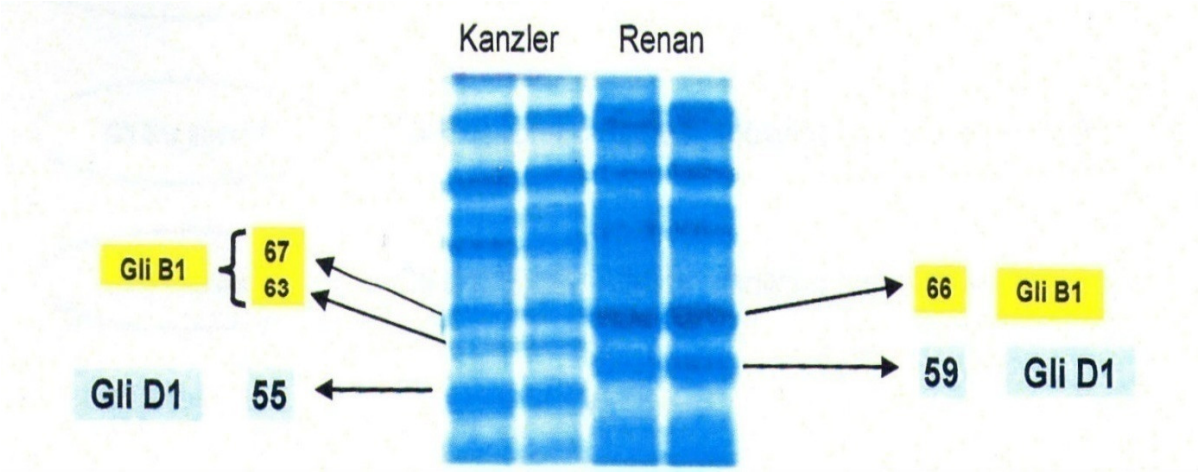
3.3. Očitavanje gelova

Ω – glijadinski lokusi su identificirani na temelju BSA vodiča za elektroforezu pšenice (slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz proteinskih vrpci ω – glijadinskih lokusa u odnosu na sortu Kanzler (izvor: BSA vodič za elektroforezu pšenice)

Identifikacija kompozicije ω – glijadina na lokusima *Gli*-B1 i *Gli*-D1 urađena je na primjeru SDS PAGE elektroforegrama sorte Kanzler i Renan prema BSA vodiču za elektroforezu pšenice (slika 7).



Slika 7. SDS PAGE elektroforegram ω – glijadinskih lokusa sorte Kanzler i Renan (izvor: BSA vodič za elektroforezu pšenice)

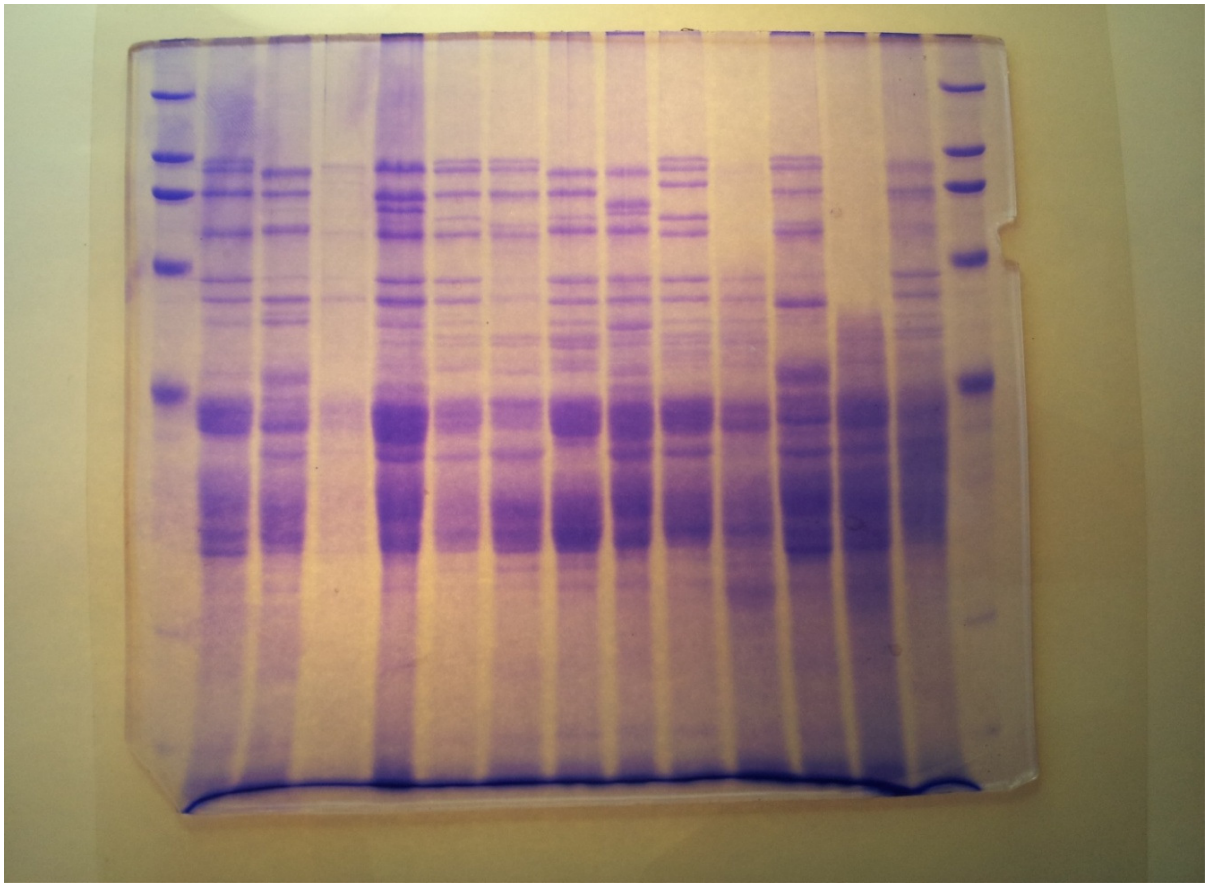
Za usporedbu podjedinica ispitivanih sorata, uključeni su standardi čije su ω – glijadinske podjedinice na lokusima *Gli*-B1 i *Gli*-D1 prikazane u tablici 5.

Tablica 5. Sastav podjedinica ω – glijadinskih lokusa ispitivanih standardnih sorata

Sorte standardi	***Gli*-B1**	***Gli*-D1**
Kanzler	63+67	55
Ritmo	63+67	55
Alidos	63+67	55
Herzog	N	55
Troll	63+67	55
Carolus	63+67	56+59

4. REZULTATI

Za utvrđivanje zastupljenosti glijadinskih lokusa korišten je elektroforegram. Slika 8 prikazuje sastav podjedinica sorti Carolus, Troll, Bc Patria, Perla, Alidos, Zlatna Dolina, Ritmo, Sirban Prolifik, Kanzler i U1.



Slika 8. Elektroforegram pojedinih ispitanih sorti (foto original; M. Grgić)

Rezultati sastava podjedinica ω– glijadinskih lokusa *Gli*-B1 i *Gli*-D1 ispitivanih sorata heksaploidne ozime pšenice nalaze se u tablici 6.

Tablica 6. Sastav podjedinica ω -glijadinskih lokusa ispitivanih sorata pšenice

Br.	Sorta	*Gli*-B1	*Gli*-D1
1.	U1	63+67	55
2.	Sirban Prolifik	N	55
3.	Zlatna Dolina	63+67	55
4.	Perla	63+67	55
5.	BC Patria	63+67	55
6.	Fiesta	N	55
7.	Gabi	63+67	55
8.	Kalista	66	55
9.	Matea	63+67	55
10.	AFZG Karla	61	55
11.	Sana	63+67	55
12	Mihelca	66	55+56+59
13.	Aura	66	59
14.	Cerera	60	55
15	Divana	60	55
16.	Žitarka	63+67	55
17.	Srpanjka	63+67	55
18	Golubica	63+67	55
19.	Aida	N	55
20.	Ilirija	66	55
21.	Libellula	61	59
22.	Avrora	63+67	59
23.	Kavkaz	63+67	55
24.	Bezostaja	66	59
25.	Renan	66	59

Analizom sastava i udjela podjedinica na ω -glijadinskom lokusu *Gli*-B1 hrvatskih i stranih sorata (tablica 7) utvrđena je najčešća kombinacija podjedinica 63+67 s frekvencijom od 48%, odnosno u 12 sorata (U1, Zlatna Dolina, Perla, BC Patria, Gabi,Matea, Sana, Žitarka, Srpanjka, Golubica, Avrora i Kavkaz). Slijedi podjedinica 66 s frekvencijom od 24%, prisutna u šest sorti (Kalista, Mihelca, Aura, Ilirija, Bezostaja i Renan). Nulti alel (N) s frekvencijom

od 12% je utvrđen u tri sorte (Sirban Prolifik, Fiesta i Aida). Podjedinica 60 je utvrđena u dvije sorte (Cerera i Divana) s frekvencijom od 8%. Podjedinica 61 je imala zastupljenost od 8%, prisutna u dvije sorte (AFZG Karla i Libellula). Među 20 hrvatskih sorata 50% zastupljenosti ima podjedinica 63+67.

Na lokusu *Gli*-D1 najzastupljenija je podjedinica 55 s frekvencijom od 76%, odnosno u 19 sorata. Podjedinica 55+56+59 je utvrđena u sorte Mihelca s frekvencijom od 4%. Podjedinica 59 je bila prisutna u pet sorata (Aura, Libellula, Avrora, Bezostaja i Renan) s frekvencijom od 20%. Među 20 hrvatskih sorata najveću zastupljenost je imala podjedinica 55 s frekvencijom od 90%.

Tablica 7. Frekvencije podjedinica ω -glijadinskih lokusa ispitivanih u dvadeset hrvatskih i pet stranih sorata ozime pšenice

***Gli*-B1**		***Gli*-D1**	
Podjedinica	Frekvencija (%)	Podjedinica	Frekvencija (%)
63+67	48	55	76
66	24	55+56+59	4
N	12	59	20
60	8		
61	8		

.

5. RASPRAVA

Za stvaranje visokorodnih i kvalitetnih sorata izrazito je važan proteinski sastav zrna pšenice. Kvaliteta brašna ovisi o sastavu i količini proteina glutena koji sadrži dvije vrste rezervnih proteina – glijadine i glutenine. Na temelju mobilnosti u gel elektroforezi, glijadini se dijele na α, β, γ i ω glijadine. Cilj ovog istraživanja je bio ispitati zastupljenost ω – glijadina koji su kodirani lokusima *Gli*-B1 i *Gli*-D1u dvadeset hrvatskih sorata ozime pšenice.

Analizom pomoću SDS-PAGE utvrđeno je da najveću učestalost imaju 63+67 podjedinice na *Gli*-B1 lokusima s frekvencijom od 50%, dok na *Gli*-D1 lokusima najveću učestalost imaju podjedinice 55 s frekvencijom od 90%. Slične rezultate dobili su Rukavina i sur. (2012.) analizom ω – glijadinskih lokusa na sortama Fiesta, Gabi, Kalista, Matea, AFZG Karla, Sana, Mihelca, Aura, Cerera, Divana, Žitarka, Srpanjka, Golubica, Aida i Ilirija gdje su na *Gli*-B1 najveću učestalost imale 63+67 podjedinice, a na *Gli*-D1 lokusu podjedinica 55. Prema istim autorima kombinacije podjedinica sa visokom frekvencijom mogu biti rezultat direktne selekcije na poželjna genetska, morfološka i fiziološka svojstva.

Obzirom na podrijetlo, pojedine analizirane hrvatske sorte se međusobno razlikuju po sastavu podjedinica ω – glijadinskih lokusa. Primjerice, sorte AFZG Karla i Sana (AGRZG) se razlikuju u podjedinicama na *Gli*-B1 lokusu; AFZG Karla ima podjedinicu 61, dok Sana ima kombinaciju podjedinica 63+67. Sorte Fiesta, Gabi i Kalista (AG) se također razlikuju u podjedinicama na *Gli*-B1 lokusu; Fiesta sadrži nulti alel N, Gabi ima kombinaciju podjedinica 63+67, dok Kalista ima podjedinicu 66. Sorte Mihelca i Aura (Bc Institut) na *Gli*-B1 lokusu imaju podjedinicu 66, dok na *Gli*-D1 lokusu Mihelca ima kombinaciju podjedinica 55+56+59, a Aura ima podjedinicu 59. Među sortama Cerera i Divana (Jošt) nema razlike u sastavu podjedinica; na *Gli*-B1 lokusu imaju podjedinicu 60, dok na *Gli*-D1 lokusu imaju podjedinicu 55, kao i većina ispitanih sorata.

Zamijećeno je da sorte nastale križanjem sa francuskom sortom Soissons (Kalista, i Ilirija) na *Gli*-B1 lokusu imaju podjedinicu 66, dok sorte Fiesta i Aida križane sa osječkim sortama (PIO) Srpanjka i Osk.3.68 na *Gli*-B1 lokusu imaju nulti alel N.

Analizom pet stranih sorata uočeno je da većina na *Gli*-D1 lokusu ima podjedinicu 59 (Libellula, Avrora, Bezostaja i Renan), uglavnom križane sa sortom Lutescens-314-h-147, dok ispitane hrvatske sorte većinom imaju podjedinicu 55 na istom lokusu.

Među ispitivanim sortama hrvatskog podrijetla, tri sadrže nulti alel (N) na *Gli*-B1 lokusu (Sirban Prolifik, Fiesta i Aida). Rukavina i sur. (2012.) su također utvrdili nulti alel kod sorti Fiesta i Aida. Prema Waga i sur. (2013.) glijadin je protein koji može uzrokovati alergene reakcije, te su na temelju istraživanja utvrdili da nulti aleli kod glijadina na *Gli*-B1 i *Gli*-D1 lokusima mogu smanjiti alergijska svojstva.

Uspoređujući genetski polimorfizam kod iranskih sorti, prema Salavati i sur. (2008.b), *Gli*-2 lokusi pokazuju mnogo veću genetičku varijabilnost u odnosu na *Gli*-1 lokuse. Kod španjolskih sorti, Ruiz i sur. (2002.) su također ustanovili veću genetičku varijabilnost na *Gli*-2 lokusima u odnosu na *Gli*-1. Aguiriano i sur. (2006.) su ispitivanjem genetičke varijabilnosti kod španjolskih, portugalskih, američkih i talijanskih sorata utvrdili da najveći polimorfizam imaju *Gli*-A2 i *Gli*-B2 lokusi, a najmanji polimorfizam pokazuju *Gli*-B1 lokusi. Qi i sur. (2009.) su uspoređujući *Gli*-1 lokuse γ–glijadina u diploidnim pšenicama, filogenetskom analizom uočili također da ne postoji znatna razlika na spomenutim lokusima.

Drugačije rezultate su dobili Zaefizadeh i sur. (2010.) identifikacijom glijadina i ispitivanjem genetske raznolikosti durum pšenice s područja sjeverozapadnog Irana i Azerbejdžana. Manji polimorfizam su imali α- i β- glijadini koji su kontrolirani većinom *Gli*-2 lokusima, nego li γ- i ω- glijadini koji se nalaze većinom na *Gli*-1 lokusima. Isto su potvrdili Tanaka i sur. (2003.) ispitivanjem japanskih sorata, gdje su veći polimorfizam imali glijadini na *Gli*-1 lokusima u odnosu na glijadine kontroliranim *Gli*-2 lokusima. Analizom hrvatskih sorata u ovom istraživanju uočen je veći polimorfizam na *Gli*-B1 lokusima u odnosu na *Gli*-D1 lokuse.

Prema Metakovsky i sur. (2000.) pretpostavlja se da je visok stupanj genetskog polimorfizma održavan uvođenjem germplazme iz različitih izvora i uočena je velika genetska razlika među španjolskim sortama. Ruiz i sur. (2002.) su također ustanovili da je germplazma španjolskih sorti vrlo polimorfna, te da je tijekom godina došlo do promjene glijadinskih alela, uglavnom zbog načina uzgoja i uvođenjem strane germplazme u procesima oplemenjivanja. Kozub i sur. (2009.) su uočili pojavu novih alela i promjene učestalosti kod već postojećih u sortama ozime pšenice koje su uzgajane na području Ukrajine u različitim vremenskim periodima, što je potvrđeno istraživanjem Ruiz i sur. (2002.) da je način uzgoja djelomično odgovoran za promjenu glijadinskih alela. Prema Đukić i sur. (2005.) razlog visokog polimorfizma glijadinskih lokusa mogu biti različita podrijetla kultivara, promjene u rekombinaciji i mutacije gena.

Prema Ruiz i sur. (2002.), glijadinski polimorfizam je vrlo važan jer glijadini služe kao genetički markeri pri identifikaciji genotipova. Slično su potvrdili Dimitrijević i Petrović (2008.) istraživanjem genetičke varijabilnosti glutenina, te su utvrdili da alelne varijacije upućuju na oplemenjivanje na kvalitetu i da pojedine kombinacije podjedinica mogu poslužiti kao orijentacijski fenotipski markeri u ranim generacijama u procesu oplemenjivanja. Ispitivanjem kompozicije glijadina i *Gli*-A1 lokusa koje je bilo usmjereno na polimorfizam, Knežević i sur. (2007.b) su determinirali različite alele i zaključili da svaki od tih alela ima specifičnu vezu sa biološkim osobinama pšenice. Također su potvrdili da se mogu koristiti kao markeri za kvalitativna svojstva, agronomska svojstva i ekološku adaptaciju.

Glijadini imaju vrlo veliku važnost jer služe kao genetski markeri u selekciji poželjnih genotipova u ranim generacijama u procesu oplemenjivanja. Visok udio podjedinica 63+67 na *Gli*-B1 lokusu kao i podjedinica 55 na *Gli*-D1 lokusu može biti rezultat selekcije na određene genetske i morfološke osobine. Dakle, za ostvarivanje ciljeva u budućem oplemenjivačkom radu vrlo je važno povezivanje glijadinskih lokusa s biološkim svojstvima.

Da bi sorte bile priznate i kvalificirane za zaštitu pod UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants) konvencijom, moraju proći DUS ispitivanje, tj potrebne su daljnje analize za ispitivanje varijabilnosti i razvijanje molekularnih markera pomoću kojih će se s većom sigurnošću moći identificirati željeni genotipovi u ranim generacijama u procesu oplemenjivanja.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanje je provedeno u svrhu ispitivanja zastupljenosti glijadinskih lokusa u dvadeset hrvatskih sorata ozime pšenice. Analizom kompozicije ω – glijadinskih lokusa heksaploidne pšenice utvrđena je najčešća kombinacija podjedinica 63+67 s frekvencijom od 50% na *Gli*-B1 lokusu. Slijedi podjedinica 66 s frekvencijom od 20%, zatim nulti alel (N) s frekvencijom od 15%, podjedinica 60 s frekvencijom od 10% i najmanje zastupljena podjedinica 61 s frekvencijom od 5%.Na *Gli*-D1 lokusu najzastupljenija je bila podjedinica 55 s frekvencijom od 90%. Na istom lokusu, podjedinice 55+56+59 i 59 su imale frekvenciju po 5%. Utvrđen je veći genetski polimorfizam na *Gli*-B1 lokusu u odnosu na *Gli*-D1 lokus..

7. POPIS LITERATURE

1. Aguiriano E., Ruiz M., Fite R., Carrilo J. M. (2006.): Analysis of genetic variability in a sample of the durum wheat (*Triticum durum Desf.*) Spanish collection based on gliadin markers; Genetic Resources and Crop Evolution (2006.) 53:1543-1552

2. Daniel C., Triboi E. (2000.): Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition; Journal of Cereal Science (Impact Factor: 1.94), 07/2000: 45-56

3. Dimitrijević M., Petrović S. (2008.): Efekt alelne varijacije glutenina visoke molekulske mase kod pšenice; 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture, February 18 – 21, Opatija, Croatia (286-289)

4. Đukić N., Matić G., Konjević R. (2005.): Biohemical analysis of gliadins of wheat *Triticum durum*; Kragujevac Journal of Science, 27, 131-138

5. Horvat D., Drezner G., Šimić G., Dvojković K. (2006.): Rezervne bjelančevine pšenice analizirane RP-HPLC metodom; Agriculture, 12, 2, 42-47

6. Knežević D., Dragovich-Yurievna A., Zečević V., Đukić N. (2007.a): Polymorphism of *Gli*-A1 alleles in winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.); Kragujevac Journalof Science, 29, 139-147

7. Knežević D., Novoselska Ya-Dragovich A. (2007.b): Polymorphism of *Gli*-D1 alleles of Kragujevac's winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.); Genetika 2007, 39,2, 273-282

8. Kozub N. A., Sozinov I. A., Sobko T. A., Kolyuchii V. T., Kuptsov S. V., Sozinov A. A. (2009.): Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the central forest-steppe of Ukraine; Tsitologiia i genetika, 43(1): 69-77

9. Martinčić, J., Kozumplik, V. (1996): Oplemenjivanje bilja. Poljoprivredni fakultet Osijek

10. Metakovsky E. V., Branlard G. (1998.): Genetic diversity of French wheat germplasm based on gliadin alleles; Theoretical and Applied Genetics, 96: 209-218

11. Metakovsky E. V., Gomez M., Vazquez J. F., Carrillo J. M. (2000.): High genetic diversity of Spanish common wheats as judged from gliadin alleles; Plant Breeding, 119, 37-42

12. Metakovsky E. V., Novoselskaya A., Kupus M. M., Sobko T. A., Sozinov A. A. (1984.): Blocks of gliadin components in winter wheat detected by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; Theoretical and Applied Genetics, 6, 559-568

13. Qi P. F., Wei Y. M., Ouellet T., Chen Q., Tan X., Zheng Y. L. (2009.): The γ –gliadin multigene family in common wheat (*Triticum aestivum*) and its closely related species; BMC Genomics, 10:168

14. Ruiz M., Rodriguez-Quijano M., Metakovsky E. V., Vazquez J. F., Carillo J. M. (2002.): Polymorphism, variation and genetic identity of Spanish common wheat germplasm based on gliadin alleles; Field Crops Research, 79, 185-196

15. Rukavina I., Marić S., Guberac V., Petrović S., Čupić T., Tepper C. (2012.): Analiza kompozicije glijadinskih lokusa hrvatske germplazme heksaploidne pšenice; Sjemenarstvo, 29, 3-4, 91-100

16. Salavati A., Boushehri A .A. S. N., Hassani M. E., Yazdi – Samadi B. (2008.a): Evaluation of Iranian bread wheats by storage proteins „gliadins“; 11th International Wheat Genetics Symposium 24 – 29 August 2008, Brisbane, QLD, Australia (283-288)

17. Salavati A., Sameri H., Boushehri A. A. S. N., Yazdi-Samadi B. (2008.b): Evaluation of Genetic Diversity in Iranian Landrace Wheat *Triticum aesativum* L. by Using Gliadin Alleles; Asian Journal of Plant Sciences, 7 (5): 440-446

18. Shewry P. R., Popineau Y., Lafiandra D., Belton P. (2001.): Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat project; Trends in Food Science & Technology, 11, 433-441

19. Strelec I. (2007.): Kemijske i biokemijske promjene starenja zrna pšenice, disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

20. Tanaka H., Tomita M., Tsujimoto H., Yasumuro Y. (2003.): Limited but specific variations of seed storage proteins in Japanese common wheat (*Triticum aestivum* L.); Euphytica, 132, 167-174

21. Van Lonkhuijsen H. J., Hamer R. J., Schreuder C. (1992.): Influence of specific gliadins on the breadmaking quality of wheat; Cereal Chemistry Journal, 69 (2): 174-177

22. Waga J., Zientarski J., Szaleniec M., Obtulowicz K., Dyga W., Skoczowski A. (2013.): Null Alleles in Gliadin Coding Loci and Wheat Allergenic Properties; American Journal of Plant Sciences, 4, 160-168

23. Wieser H. (2007.): Chemistry of gluten proteins; Food Microbiology, 2, 115-119

24. Xu J., Bietz A. J., Carriere C. J. (2007.): Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions; Food Chemistry, 101, 1025-1030

25. Zaefizadeh M., Jamaati-e-Somarin S., Ojaghi J., Seyedi S. M., Zabihi-e-Mahmoodabad R., Ochi M. (2010.): Genetic diversity for gliadin patterns of durum wheat landraces in the Northwest of Iran and Azerbaijan; Pesquisa Agropecuária Brasilera, Brasilia, 45, 11, 1425-1432

26. Zhang W., Gianibelli M. C., Ma W., Rampling L., Gale K. R. (2002.): Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ-gliadin alleles in *Triticum aestivum*;Theoretical and Applied Genetics, 107, 130-138

27. Zillman R. R., Bushuk W. (1979.): Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. II. Effects of environmental and experimental factors on the gliadin electrophoregram; Canadian Journal of Plant Science 59: 281-286

28. Žilić S., Barać M., Pešić M., Dodig D., Ignjatović-Micić D. (2011.): Characterization of Proteins from Grain of Different Bread and Durum Wheat Genotypes; International Journal of Molecular Sciences, 12, 5878-5894

29. Electrophoresis Training Course „Identification of Gliadin-Alleles in *Triticum aestivum* using SDS-PAGE“ (2007.), Bundessortenamt, Referat 411

Mrežni izvori:

1. https://vutra.org/threads/landrace.819/

8. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati i utvrditi zastupljenost glijadinskih lokusa u dvadeset hrvatskih sorata ozime pšenice. Za analizu i identifikaciju podjedinica na *Gli*-B1 i *Gli*-D1 lokusima korištena je poliakrilamid gel elektroforeza (PAGE) u prisutnosti natijeva dodecil sulfata (SDS). Na *Gli*-B1 lokusima najveću zastupljenost su imale kombinacije podjedinica 63+67 s frekvencijom od 50%, dok je najmanju zastupljenost imala podjedinica 61 s frekvencijom od 5%. Prisutne su bile i podjedinice 60, 66 i nulti alel (N). Na *Gli*-D1 lokusu najzastupljenija je bila podjedinica 55 s frekvencijom od 90%, prisutna je bila kombinacija podjedinica 55+56+59 s frekvencijom od 5%, te podjedinica 59 s frekvencijom također od 5%.

9. SUMMARY

The aim of this study was to examine and determine distribution of *Gli*-B1 and *Gli*-D1loci in twenty Croatian winter wheat varieties using SDS-PAGE. At *Gli*-B1 loci we determined prevalence of subunits 63 + 67 combination with a frequency of 50%, while the lowest prevalence had subunit 61 with a frequency of 5%. Subunits 60, 66 and null allele (N) were also present. At *Gli*-D1 locus, the most common subunit was 55 with a frequency of 90%, combination of subunits 55 + 56 + 59 and the subunit 59 were also present with frequency of 5%.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1.Godina priznavanja, podrijetlo i pedigre sorata ozime pšenice

Tablica 2. Godina priznavanja, podrijetlo i pedigre standard sorti

Tablica 3. Ekstrakcijske otopine za izolaciju glijadina i glutenina

Tablica 4. Otopine za pripremu gelova i elektroforezu

Tablica 5. Sastav podjedinica ω – glijadinskih lokusa ispitivanih standardnih sorata

Tablica 6. Sastav podjedinica ω - glijadinskih lokusa ispitivanih sorata pšenice

Tablica 7. Frekvencije podjedinica ω - glijadinskih lokusa ispitivanih u dvadeset hrvatskih i pet stranih sorata ozime pšenice

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz dijela pšenice iz kojeg je moguća izolacija glijadina i glutenina (izvor: BSA vodič za elektroforezu pšenice)

Slika 2. Aparatura za elektroforezu s izlivenim gelovima (foto original; M. Grgić)

Slika 3. Prikaz plastične komore pričvršćene na staklima u koju se izljeva pufer za elektroforezu (foto original; M. Grgić)

Slika 4. Postupak elektroforeze na uređaju SE 600 Ruby® (foto original; M. Grgić)

Slika 5. Bojanje gelova (foto original; M. Grgić)

Slika 6. Shematski prikaz proteinskih vrpci ω – glijadinskih lokusa u odnosu na sortu Kanzler (izvor: BSA vodič za elektroforezu pšenice)

Slika 7. SDS PAGE elektroforegram ω – glijadinskih lokusa sorte Kanzler i Renan (izvor: BSA vodič za elektroforezu pšenice)

Slika 8. Elektroforegram pojedinih ispitanih sorti (foto original; M. Grgić)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij, smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

ZASTUPLJENOST GLIJADINSKIH LOKUSA GERMPLAZME HRVATSKE OZIME PŠENICE

Marija Grgić

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati i utvrditi zastupljenost glijadinskih lokusa u dvadeset hrvatskih sorata ozime pšenice. Za analizu i identifikaciju podjedinica na *Gli*-B1 i *Gli*-D1 lokusima korištena je poliakrilamid gel elektroforeza (PAGE) u prisutnosti natijeva dodecil sulfata (SDS). Na *Gli*-B1 lokusima najveću zastupljenost su imale kombinacije podjedinica 63+67 s frekvencijom od 50%, dok je najmanju zastupljenost imala podjedinica 61 s frekvencijom od 5%. Prisutne su bile i podjedinice 60, 66 i nulti alel (N). Na *Gli*-D1 lokusu najzastupljenija je bila podjedinica 55 s frekvencijom od 90%, prisutna je bila kombinacija podjedinica 55+56+59 s frekvencijom od 5%, te podjedinica 59 s frekvencijom također od 5%.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: doc.dr.sc. Sonja Petrović
Broj stranica: 35
Broj tablica: 7
Broj slika: 8
Broj literaturnih navoda: 29
Broj priloga:
Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: pšenica, ω-glijadini, podjedinica, SDS PAGE
Datum obrane:
Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof.dr.sc. Sonja Marić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Ivica Strelec, član

Rad je pohranjen u:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture in Osijek
University Graduate Studies, Plant breeding and seed science

DETERMINATION GLIADIN LOCI OF CROATIAN WINTER WHEAT GERMPLASM

Marija Grgić

Abstract:

The aim of this study was to examine and determine distibution of *Gli*-B1 and *Gli*-D1 loci in twenty Croatian winter wheat varieties using SDS PAGE. At *Gli*-B1 loci we determined prevalence of subunits 63+67 combination with a frequency of 50%, while the lowest prevalence had subunit 61 with a frequency of 5%. Subunits 60, 66 and null allele (N) were also present. At *Gli*-D1 locus, the most common subunit was 55 with a frequency of 90%, combination of subunits 55 + 56 + 59 and the subunit 59 were also present with frequency of 5%.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: doc.dr.sc. Sonja Petrović
Number of pages: 35
Number of tables: 7
Number of figures: 8
Number of references: 29
Number of appendices:
Original in: Croatian
Key words: wheat, ω-gliadins, subunits, SDS PAGE
Thesis defended of date:
Reviewers:

1. prof.dr.sc. Sonja Marić, chairmain
2. doc.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Ivica Strelec, member

Thesis deposited at: