Identifikacija Vrn gena u hrvatskom sortimentu ozime pšenice

Puškarić, Josipa

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:151:232497

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

Josipa Puškarić, apsolvent

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

IDENTIFIKACIJA *Vrn* GENA U HRVATSKOM SORTIMENTU OZIME PŠENICE

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Josipa Puškarić, apsolvent

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

IDENTIFIKACIJA *Vrn* GENA U HRVATSKOM SORTIMENTU OZIME PŠENICE

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskoga rada:

prof. dr. sc. Sonja Marić, predsjednik

doc. dr. sc. Sonja Petrović, mentor

doc. dr.sc. Andrijana Rebekić, član

Osijek, 2015.

Istraživanje u ovom diplomskim radu je obavljeno u sklopu Uspostavnog istraživačkog projekta “Stvaranje pšenice za budućnost – potraga za novim genima iz postojećih izvora” (br.2000) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1 Cilj istraživanja 3

2. Pregled literature 4

2.1. Istraživanja o utjecaju vernalizacije u oplemenjivanju pšenice 4

2.2. Istraživanja varijabilnost *Vrn* gena na genetskoj razini 7

3. Materijal i metode 11

3.1. Biljni materijal 11

3.2 Laboratorijski pokus 11

3.2.1. Uzgoj klijanaca 13

3.2.2. Izolacije genomske DNA 14

3.2.3. Provjera čistoće i koncentracije DNA 18

3.2.4. PCR analiza 20

3.2.5. Elektroforeza 25

3.2.6. Očitavanje rezultata 27

4. Rezultati 28

5. Rasprava 35

6. Zaključak 40

7. Popis literature 41

8. Sažetak 49

9. Summary 50

10. Popis tablica 51

11. Popis slika 52

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic documentation card

1. Uvod

Pšenica (*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*) je prema zapisima poznata više od 10 000 godina te je prije 5000 godina uzgajana u istočnom dijelu Europe. Naziv „pšenica“ zajednički je svim Slavenima. Taj najvažniji ratarski usjev dobro se prilagođava klimi i tlu, te je zastupljen u proizvodnji diljem svijeta. Prvenstveno se uzgaja radi zrna, a pšeničnim kruhom hrani se oko 70% svjetskog stanovništva. Najvažniji pokazatelj kvalitete pšenice je količina bjelančevina u zrnu, posebno glutena. Pšenični kruh bogat je vitaminima B kompleksa i važnim mikroelementima. Osim u prehrambenoj industriji za proizvodnju kruha i tjestenine, pšenica se koristi i u industriji keksa, kolača, piva, farmaceutskoj industriji te za proizvodnju koncentrirane stočne hrane. Pšenica je jedan od najvažnijih artikla u međunarodnoj trgovini te ima veliku stratešku ulogu (Martinčić i Kozumplik, 1996.). Prema FAO podacima za 2012. godinu pšenica je četvrta (iza šećerne trske, kukuruza i riže) na ljestvici ukupne svjetske proizvodnje sa 670 875 110 tona na 215 489 485 ha s prosječnim prinosom od 3113,3 kg/ha. Prvo je mjesto zauzela na europskoj ljestvici ukupne proizvodnje 2012. godine sa 195 824 091 tona. U Republici Hrvatskoj ukupna proizvodnja pšenice s prosječnim prinosom 5 347,3 kg/ha iznosila je 999 681 tonu (FAOStat, 2012.).

Povećanjem broja stanovnika, raste i potreba za proizvodnjom visokorodnih kultivara koji će moći zadovoljiti svjetske potrebe za hranom. Stvaranje stabilnih, visokorodnih i kvalitetnih heksaploidnih kultivara uvjetovano je s više čimbenika od kojih je jedan vernalizacija.

Razlike između ozime i jare pšenice očituju se u potrebama za niskim temperatura od faze sjemena. Osim toga ozime pšenice zahtijevaju razdoblje izloženosti niskim temperaturama kako bi aktivirale reproduktivni razvoj. To je proces vernalizacije (Fanning, 2012.).

Ruski genetičar Trofim Lysenko, koji je proučavao učinak hladnoće na cvatnju, tvorac je pojma jarovizacije. Jare pšenice su nazvane „jarovoe“ na ruskom jeziku (izvedeno od Jara, boga proljeća), a izlaganja hladnoći ozimih žitarica uvjetuje „jarovoe“ (brzo cvjetanje). Jarovizacija je prevedena s ruskog na vernalizaciju, „vernal“ je izvedeno iz latinske riječi za proljeće, „*vernum*“ (Chouard, 1960.).

Niske temperature u određenim fazama razvoja žitarica su potrebne kako bi došlo do klasanja i formiranja zrna. Vernalizacija je proces stjecanja ili ubrzanja sposobnosti biljke kako bi cvjetala i to pomoću niske temperature (Chouard, 1960.). Do klasanja dolazi kada se zadovolje zahtjevi za temperaturom tijekom te duljinom razdoblja same vernalizacije (50 dana optimalno) (Griffith, 2013.), dok je glavni centar kontrole u samom vrhu izdanka (Amasino, 2004.). Vernalizacija je nasljedna osobina koja sprječava ozime pšenice u preranom razvijanju meristema kako ne bi došlo do smrzavanja. Tri su temperaturne razine: minimum ispod kojeg ne dolazi do vernalizacije (većinom od -1,3°C do -4°C) te optimalna kada je vernalizacija u potpunosti učinkovita (obično između 3°C i 10°C, s vrhuncem na 4,9°C) i najviša iza koje vernalizacija prestaje (15,7°C). Biljke postaju osjetljive na vernalizaciju čim sjeme upije dovoljno vode kada dolazi do pucanja sjemene ljuske. Prije klijanja važna je temperatura tla, a nakon klijanja temperatura zraka (Griffith, 2013.). Ako ne dođe do vernalizacije, u ozime pšenice, biljke ostaju u vegetativnoj fazi i neće dati urod (Fanning, 2012.).

Na molekularnoj razini, duljina razdoblja vernalizacije za krušne pšenice određena je uglavnom s tri lokusa: *Vrn-1*, *Vrn-2* i *Vrn-3*. Najvažniji mehanizam reguliranja vernalizacije je epistatička interakcija *Vrn-1* i *Vrn-2* lokusa. Kako se smanjuje utjecaj *Vrn-2* lokusa, *Vrn-1* transkripcija se postupno povećava, što omogućava razvoj biljke, a čak samo jedan *Vrn-2* alel može zaustaviti njen razvoj (Yan i sur., 2003.; 2004.). U heksaploidnim pšenicama *Vrn-A1*, *Vrn-B1* i *Vrn-D1* geni su dominantni za jare kultivare i epistatični za alele u ozimim kultivarima (Stelmakh, 1987.). Gen *Vrn-A1* mapiran je na dugom kraku 5A kromosoma u blizini gena *Fr1* (Snape i sur., 2001.), što je usko vezano s tri RFLP markera: *Xwg644*, *Xpsr426* i *Xpsr2021* (Korzun i sur., 1997; Sarma i sur., 1998;. Sutka i sur., 1999; Snape i sur., 2001.). Snape i sur. (2001.) su također odredili položaj gena *Vrn-D1* u distalnom dijelu dugog kraka 5D kromosoma te pokazao da je taj gen usko povezan s mikrosatelitnim markerima *Xgwm212* i *Xgwm292*. Gen *Vrn-B1* mapiran je u distalnom dijelu dugog kraka kromosoma 5B i usko je povezan s dva mikrosatelitna markera: *Xgwm408* i *Xgwm604* (Leonova i sur, 2003; Tóth i sur., 2003.). Vrsta alela na *Vrn-A1* lokusu rezultirana je mutacijama unutar promotorskog slijeda (Yan i sur., 2004.) ili delecijama unutar prvog introna tog gena (Fu i sur., 2005.). Na *Vrn-B1* i *Vrn-D1* lokusu, promjene u sekvenci promotora nisu opažane; njihova varijacija alela određena je samo brisanjem unutar prve sekvence introna (Fu i sur., 2005.). Gen *Vrn-2* je opisan samo u *Triticum monococcum* L. (Yan i sur., 2004.). Yan i sur. (2006.) su identificirali gen *Vrn-B3*

kojega se smatra promotrom cvatnje i smješten („mapiran“) je na kratkom kraku kromosoma 7B (povezan je s mikrosatelitnim markerima *ABC158* i *GWM569*). Na kromosomu 3B (Miura i Worland, 1994.), 6A, 6B i 6D (Islam-Faridi i sur., 1996.) identificirani su različiti geni koji kontroliraju proces vernalizacije te utječu na prijelaz iz vegetativne u generativnu fazu. Najčešće ispitivani heksaploidni kultivari su iz SAD-a, Kanade i Kine.

Produžena izloženost niskim temperaturama tijekom zime potiče ekspresiju *Vrn-1* koji pak pokreću vršni meristem prema reproduktivnoj fazi. Vernalizacija završi nakon što meristem biljke dosegne fazu dva nodija. *Vrn-1* gen kojeg nosi ozima pšenica aktivira se samo kako bi potaknuto razvoj nakon vernalizacije, dok jare pšenice nose verziju *Vrn-1* koja je uvijek aktivna.

Međutim, vernalizacija nije jedini faktor koji utječe na cvjetanje ozime pšenice. Tu je i fotoperiodizam.

2.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati genetsku varijabilnost *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* te *Vrn-D1* lokusa u 23 hrvatska i 17 stranih ozimih kultivara korištenjem molekularnih markera.

2. Pregled literature

2.1. Istraživanja o utjecaju vernalizacije u oplemenjivanju pšenice

Prvo istraživanje u kojem su opisivana izlaganja hladnim temperaturama kao specifičnom aspektu zime koje su bile potrebne za pravilan razvoj i cvjetanje kod nekih vrsta, objavljeno je u drugoj polovici 19. stoljeća. Istraživanje Gassnera (1918.) se najčešće navodi kao prvo izvješće koje govori da veliki broj biljnih vrsta zahtjeva izlaganje hladnim temperaturama kako bi cvjetalo.

U međuvremenu, Garner i Allard (1920.) su istraživali važnost utjecaja dužine izlaganja svjetlosti na rast biljaka. Pšenica je svrstana u biljke dugog dana (*LDP - long day plants*), koje cvatu tek kad su osvjetljene dovoljno dugo, tj. kada prođu kritičnu granicu za fotoperiodizam.

Gassnerova istraživanja (1918.) oblikuju koncept vernalizacije koji uključuje epigenske promjene u biljaka poslije razdoblja hladnih dana, koje dovode do razvoja klasa (Heo i Sung, 2011.).

Vernalizacija sjemena na ~ 2°C, ili za razdoblja kraća od 1 do 2 tjedna na 1°C rezultirala je malim ili nikakvim ubrzanjem razvoja klasa u usporedbi s kontrolom bez vernalizacije. Najraniji odgovori na vernalizaciju su pri 1°C postignuti nakon 9 tjedana. Produžavanje vremena vernalizacije sjemena na 19 tjedana rezultira stvaranjem najmanje pet listova prije razvoja klasa. Najveći induktivni rezultat hladnih temperatura u razvoju biljaka pojavljuje se između 6 do 10 tjedana. Biljke ozime pšenice vernalizirane 6 tjedana s prosječnim tjednim temperaturama od ~ 7°C nisu bile devernalizirane temperaturama koje su slijedile od 29°C do 35°C. Starenjem biljke i kratkim fotoperiodizmom prije tretmana hladnim temperaturama poboljšali su induktivne rezultate i smanjili vrijeme razvoja klasa nakon hladnih temperatura (Ahrens, 1957.).

U nedostatku hladnih temperatura, fotoperiodi od 11, 13, 15,5 te 18 h primijenjeni tijekom šestotjednog razdoblja rezultirali su neznatnim promjenama u potpomaganju početka razvoja cvijeta. Međutim, nastavak kratkih dana u vernaliziranih i nevernaliziranih

kultivara značajno su usporili klasanje. Posljedice fotoperiodizma nisu bile kritične za biljku kratko vrijeme poslije sjetve ozime pšenice ili tek prije početka klasanja. Kratki dani nakon vernalizacije povećavaju broj klasića u razvoju, broj listova, duljinu klasa te poboljšavaju busanje (Ahrens, 1957.). Isti autori navode da giberelinska kiselina nije ubrzala razvoj ili inicirala nevernaliziranje pšenice, iako je dala značajne rezultate u rastu biljke. Ni giberelinska kiselina, niti c-naftalen octena kiselina te trijod benzojeva kiselina nisu poboljšale utjecaje tretmana indukcijom suboptimalnih hladnih temperatura (Ahrens. 1957.).

Hansel (1953.) je proširio istraživanje Purvisa (1948.) i opisao kvalitativnu shemu ovisnosti vernalizacije o temperaturi na ozimom kultivaru raži (Petkus). Ta shema, zajedno s pronalascima Ahrensa i Loomisa (1963.) te Trionea i Metzgera (1970.) poslužila je za formiranje temelja za nekoliko modela koji pokušavaju simulirati kvantitativnu reakciju pšenice (*Triticum aestivum* L.) na vernalizaciju (Weir, 1984.; Reinink i sur., 1986.; Ritchie, 1991.). Hanselova shema, međutim, temeljena je na posljedicama vernalizacije (tj. stopi napretka cvatnje) umjesto na samom procesu vernalizacije. Chouard (1960.) definira vernalizaciju kao stjecanje ili ubrzanje sposobnosti cvatnje po hladnom tretmanu te naglašava da takvo djelovanje nije vidljivo na prvi pogled, nego se pojavljuje kao posljedica u obliku inicijacije cvatnje.

Većina istraživanja vernalizacije morala se osloniti na tu posljedicu u obliku cvatnje kao test učinkovitosti bilo kakvog tretmana temperaturom. U nekim slučajevima mjerena su trajanja od kraja tretmana vernalizacije do stalne faze razvoja klasa (npr. Ahrens i Loomis, 1963.). U drugim slučajevima, napredak ka cvatnji je procijenjen na određeno vrijeme od kraja tretmana vernalizacijom (npr. Purvis, 1948; Trione i Metzger, 1970.). Međutim niti jedna od navednih metoda ne razlikuje učinke vernalizacije od učinaka kontinuiranog vegetativnog razvoja tijekom vernalizacije na temperaturama većim od 0°C. Nejasnost se očituje kao razlika u broju listova nastalih u fazi vlatanja tijekom tretmana vernalizacije prije promjene faza razvoja, a taj broj listova pak izravno utječe na stopu reproduktivnog razvoja u okolini poslije tretmana. Svaka metoda procjene osjetljivosti na temperature vernalizacije temeljene po razvojnom kriteriju, mora uzeti u obzir i opseg i posljedice nastavka vegetativnog razvoja tijekom vernalizacije.

Hoogendoorn (1984.) je opisao metodu procjene za mjere opsega rasta tijekom tretmana vernalizacije temeljenu na ranom razvoju lista tijekom trajanja samog tretmana. Iako se temelji na nastanku primordija, ova metoda je korištena samo kao usporedba ekvivalentnog trajanja dvaju različitih temperaturnih tretmana vernalizacije. Ni jedna spoznaja nije ukazala na važnost stvarnog broja listova započetih prije inicirane cvatnje u različitim tretmanima, niti posljedičnog utjecaja koje to ima na trajanje od kraja tretmana do pojave klasa ili cvatnje.

Kirby (1974.) je predstavio kvantitativnu analizu razvoja pšenice temeljenu na sekvencijalnom razvoju lista i primordija klasića. Analizu su proširili Hay i Kemp (1990.) i Kirby (1990.) kako bi uključili snažan element koordinacije između stvaranja primordija na vrhu i pojave lista. U proširenom istraživanju, stvaranje rukavca se gleda kao središnji događaj u životnom ciklusu glavnog izdanka i to obilježava prijelaz iz vegetativnog u reproduktivni razvoj i početak produljenja vrha biljke (Hay i Kirby, 1991.).

U jarih pšenica razvijenih u danima duge svjetlosti, postoji neposredno povećanje stope proizvodnje primordija vršnog izdanka (Kirby, 1974.), što označava prijelaz iz vegetativne faze nastanka primordija lista u reproduktivnu fazu nastanka primordija klasića. Vrijeme tog prijelaza ovisi o genetski određenim potrebama prema fotoperiodizamu i vernalizaciji. U manje izazovnim sredinama, nekoliko prvih primordija klasića mogu se razviti istom brzinom kao i primordiji lista (Delecolle i sur., 1989;. Brooking i sur., 1995.).

Davidson i sur. (1985.) su postavili pokus u stakleniku u kojem su ispitivali foroperiodizam u uvjetima od 16h pri čemu su se razdvojile nevernalizirane biljke u dvije posebne skupine, sukladno do tad već poznatim jarim i ozimim kultivarima. Potrebe za vernalizacijom (*vernalization response*) su bile općenito male kod prirodne izloženosti suncu (11-15 h), ali su bile izraženije u uvjetima duge izloženosti suncu, naročito kod ozimih kultivara pšenice. Rezultati drugoga pokusa ukazali su na velike statistički značajne razlike u odnosu na tretman vernalizacije. Nakon 8 tjedana vernalizacije i dugim fotoperiodizmom, svi kultivari počeli su klasati unutar 66 dana, dok je 6 tjedana tretmana rezultiralo nepotpunom vernalizacijom.

Tranquilli i Dubcovsky, (2000.) došli su do zaključka da u diplodine pšenice (kao i u nekih drugih žitarica) dva lokusa, jedan dominantan, drugi recesivan, razlikuju ozime od jarih

kultivara. Geni *Vrn-A^{m}1* i *Vrn-A^{m}2* kontroliraju potrebe za vernalizacijom kod diploidnih pšenica (*Triticum monococcum* L.). Korištenjem faktorijalne analize varijance ispitivana je epistatska interakcija između ta dva gena te njihov utjecaj na datum klasanja. Usporedbe rezultata pokazale su da je *Vrn-A^{m}2* alel za ozime pšenice dominantan u odnosu na *vrn-A^{m}2* kod jarih pšenica, dok je *Vrn-A^{m}1* alel za jare kultivare dominantan u odnosu na *vrn-A^{m}1* ozimih kultivara. Utvrđena je značajna interakcija između ta dva gena, dokazujući da ti geni djeluju na istom razvojnom putu.

Ispitivani genotipovi ozimih kultivara pšenica vjerojatno sadržavaju različite alele koji utvrđuju vernalizaciju. Različiti odgovori na vernalizaciju ozimih kultivara rezultat su prisutnosti multiplih alela na *Vrn* lokusu. Različite kombinacije alela mogu biti izvor genotipova s nižom ili višom osjetljivosti na vernalizaciju. Nepotpuna vernalizacija manifestira se kao odgoda ili čak odsutnost klasanja. Općenito, kašnjenje klasanja, ovisi eksponencijalno o stupnju nedostatka vernalizacije. Vrijeme do klasanja također je uvjetovano različitim odgovorima genotipova na fotoperiodizam; ali njegov rezultat nije značajno promjenjen vernalizacijom (Košner i Pánková, 2002.).

2.2. Istraživanja varijabilnosti *Vrn* gena na genetskoj razini

Tijekom povijesti, promatranje biljaka dovelo je do temeljnih načela razumijevanja kako biljke reagiraju na okoliš. Dok ta istraživanja mogu donekle pokazati međusobnu vezu uzroka i posljedice kako se biljka razvija, ne mogu se potpuno objasniti mehanizmi djelovanja bez uvida na molekularnoj razini.

Tri genetska sustava, uključujući osjetljivost na vernalizaciju (*Vrn*), osjetljivost na fotoperiodizam (*PPD*) i rano klasanje samo po sebi, kontroliraju faze rasta i razvoja pšenice (Herndl i sur. 2008.). Potencijal prinosa pšenice u različitim sredinama je, uglavnom određen s ta tri sustava i njihovom interakcijom s temperaturom u okruženju (Gororo i sur. 2001.).

Prema Iwaki i sur. (2000.), četiri glavna lokusa *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* i *Vrn-D5* kontroliraju osjetljivost na vernalizaciju u pšenice. Prisutnost recesivnih alela na navedenim lokusima javlja se u ozimih kultivara, dok prisustvo jednog ili više dominantnih

alela u tim lokusima rezultira jarom pšenicom. Dominantni *Vrn* aleli imaju diferencijalnu osjetljivost na vernalizaciju. Kultivari pšenice s dominantnim alelom *Vrn-A1* su neosjetljivi na vernalizaciju, dok oni kultivari koji imaju dominantne alele na *Vrn-B1*, *Vrn-D1* ili *Vrn-D5* lokusima imaju malu osjetljivost na vernalizaciju (Shindo i Sasakuma, 2002.). Alel *Vrn-A1* prikriva nisku osjetljivost na vernalizaciju drugih dominantnih alela.

Također, kultivari krušne pšenice s dominantnim *Vrn-A1* alelom klasaju najranije, dok oni s dominantnim *Vrn-D1*, *Vrn-D5* i/ili *Vrn-B1* klasaju kasnije, odnosno, pod nevernalizacijskim uvjetima (Goncharov, 2004.). Osim mijenjanja vremena cvatnje, različite kombinacije dominantnih *Vrn* alela također mogu uzrokovati varijabilnost u visini biljke i utjecati na komponente prinosa pšenice (Stelmakh, 1992; Stelmakh, 1998.). Prisutnost dvaju dominantnih alela na glavnom lokusu za vernalizaciju daje ranu zrelost, kao i veći potencijal prinosa. Kombinacija dominantnih *Vrn-A1a*, *Vrn-B1* i *Vrn-D1* alela rezultiraju najranijom zrelosti, ali i stvaranje kultivara niskog prinosa. Potreba za djelomičnom vernalizacijom također može biti korisna za poboljšanje tolerancije na mraz (Iwaki i sur. 2001.).

U jarih kultivara na *Vrn-A1* lokusu krušne pšenice može doći do mutacija u promotorskoj regiji (Yan i sur. 2004.), dok su jari kultivari određeni *Vrn-B1* i *Vrn-D1* lokusima velikim brisanjem unutar prvog introna (Fu i sur., 2005.). Ovi rezultati doveli su do razvoja specifičnih DNA markera za *Vrn* alele kako bi otkriti prisutnost ili odsutnost *Vrn* alela u germplazmi pšenice te razumjeli njihovu ulogu u adaptaciji pšenice različitim zemljopisnim područjima (Yan i sur., 2004; Fu i sur., 2005.).

Iqbal i sur. (2011.) su istraživali vernalizaciju na genetskoj razini na krušnoj pšenici (*Triticum aestivum* L.). Istraživanje su proveli kako bi utvrdili postojanje kombinacije alela na *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* te *Vrn-B3* lokusu na 59 jarih pšenica. Koristili su već prije pronađene DNA markere za otkrivanje varijabilnosti alela na četiri *Vrn* lokusa. Alel jarih pšenica *Vrn-A1a* bio je pronađen u 36% kultivara, kao samostalan ili s ostalim alelima jarih pšenica, *Vrn-B1* i *Vrn-D1*. Dominantni *Vrn-A1c* alel pronađen je samo u dva kultivara, dok *Vrn-A1b* alel nije bio pronađen niti u jednom. Alel jare pšenice *Vrn-B1* najviše se puta pojavljivao, u 64% kultivara, sam ili s ostalim dominantnim alelima. Dominantni *Vrn-D1* pronađen je u 61% kultivara, s tim da je u 25% pronađen sam, a u

29% kultivara zajedno s *Vrn-B1*. Dominantni *Vrn-B3* bio je odsutan u svim proučavanim kultivarima. Nije pronađena nikakva povezanost vremena klasanja sa sastavom *Vrn-B1* i *Vrn-D1* alela.

Kiss i sur. (2014.) su pokušali dijagnosticirati molekularne markere za određivanje glavne vrste alela u *Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1* u 683 različitih genotipova iz svjetske zbirke. Dominantni *Vrn-A1, Vrn-B1* te *Vrn-D1* alel bili su prisutni u niskim frekvencijama. Sastav alela na *Ppd-D1, Ppd-B1* i *Vrn-D1* lokusu značajno je utjecao na klasanje i zajedno objašnjava 37,5% fenotipske varijance. Najranije klasanje pojavilo se kod genotipova koji su imali alel neosjetljiv na fotoperiodizam na *Ppd-D1* i *Ppd-B1* lokusu i sa jarim alelom za *Vrn-D1* i ozime alele za *Vrn-A1* i *Vrn-B1*.

Genetske analize identificirale su tri glavna gena povezana s osjetljivosti na vernalizaciju kod pšenice: *Vrn1, Vrn2* i *Vrn3*. Ključni gen za temperaturnu osjetljivost je *Vrn1*. Produžena izlaganja niskim temperaturama tijekom zime dovode do ekspresije *Vrn1* gena koji pak pokreće vršni meristem prema reproduktivnoj fazi. Vernalizacija završava nakon što meristem biljke dosegne dva nodija (Griffith, 2013.).

U ozime pšenice *Vrn1* gen se aktivira samo kako bi potaknuo razvoj pšenice nakon vernalizacije, što je korisno za biljku zbog odgode klasanja do proljeća, kada se postignu uvjeti pogodni za proizvodnju zrna. Nasuprot tome, jare pšenice ne zahtijevaju niske temperature kako bi se aktivirale. One nose *Vrn1* alele koji su uvijek aktivni, a o kombinaciji alela ovisi i vrijeme klasanja. Navedeno svojstvo odgode klasanja postaje sve važnije ako su sjetve odgođene do kasne zime i ranog proljeća, kada su temperature više i duljina dana je sve duža (Griffith, 2013.).

Vernalizacija u kultiviranim pšenicama uglavnom je pod kontrolom tri *Vrn1* lokusa, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* i *Vrn-D1*, koji se nalazi u sredini dugog kraka kromosoma 5A, 5B i 5D (Mcintosh i sur., 2003.). Ozimi kultivari su homozigoti za recesivni alel na tri *Vrn-1* lokusa. (Braun, 1997., prema Stelmakh, 1987.). *Vrn-1* gen je kloniran u početku kod *Triticum monococcum* L. (Yani sur., 2003.), a kasnije su polimorfizmi u *Vrn1* promotoru (Yan i sur., 2004.) i regijama introna (Fu i sur., 2005.) bili povezani s jarim kultivarima krušne i durum pšenice.

Identificirano je nekoliko alela za glavne *Vrn-A1* gene vernalizacije. Recesivni je samo *vrn-A1* alel, dok je *Vrn-A1* najuvjerljiviji jari alel, uzrokujući potpunu neosjetljivost na vernalizaciju. Alel *Vrn-A1b* pokazuje nekoliko polimorfizama na razini jednog nukleotida (SNP, single-nucleotide polymorphism) i delecije u promotorskim regijama, obično delecije od 20-pb. Alel *Vrn-A1c* pronađen je samo u heksaploidnom kultivaru iz Afganistana, ali je čest među tetraploidnim jarim genotipovima. U jare tetraploidne pšenice tipično se javljaju delecije od 32 pb u promotorskoj regiji alela *Vrn-A1d*, dok se kod alela *Vrn-A1e* javljaju delecije od 54 pb u području promotora. Aleli za jare kultivare na *Vrn-B1* i *Vrn-D1* lokusu imaju značajne delecije u prvom intronu. Gen *Vrn-B3*, koji se nalazi na kraku kromosoma 7BS, prvi je put pronađen u kultivaru Hope (Yan i sur., 2006.).

Gen *Vrn2* je također jako važan za proces vernalizacije, ujedno je i represor dugog dana za *Vrn3*. Dva su gena prisutna na *Vrn2* lokusu (*ZCCT1* i *ZCCT2*), a delecije ili pojava nefunkcionalnih mutacija u oba od njih istovremeno uvjetuju nastajanje jarih kultivara bilo kod diploidnih ili tetraploidnih pšenica (Distelfeld, 2009.).

3. Materijal i metode

3.1 Biljni materijal

Istraživanje je provedeno na 40 kultivara heksaploidne krušne pšenice (*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*). Od kojih su 23 hrvatskog, a 17 kultivara stranog podrijetla. Pri odabiru hrvatskih kultivara, vodilo se računa da budu uključeni kultivari iz svih pet oplemenjivačkih centara u Republici Hrvatskoj. Od 23 hrvatska kultivara, 11 je stvoreno na Poljoprivrednom institutu Osijek (POI), pet na BC Institutu (Zagreb), tri pripadaju oplemenjivačkoj kući Jošt sjeme - istraživanja d.o.o. (Križevci), dva oplemenjivačkoj kući Agrigenetics d.o.o., Osijek (AG) i jedan Agronomskom fakultetu u Zagrebu (AGRZG). Kultivari su priznati između 1936. i 2010. godine (tablica 1). Od 17 stranih kultivara, šest je srpskih, tri su mađarska, dva njemačka, dva talijanska te po jedan ukrajinski, ruski, kineski i švicarski kultivar (tablica 2).

Kultivari su odabrani obzirom na podrijetlo, rodoslovlje, godinu priznavanja, područje uzgoja te značajnost i zastupljenost u proizvodnji. Neki od kultivara uključenih u istraživanje korišteni su kao standardi prilikom identifikacije *Vrn* gena koji su za te kultivare utvrđeni prethodnim istraživanjima.

3.2 Laboratorijski pokus

Istraživanje varijabilnosti *Vrn* gena na razini DNA provedeno je u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku tijekom 2013./2014. te 2014./2015. Prilikom ispitivanja korištena je metoda mikrosatelitnih markera bazirana na lančanoj reakciji polimerazom (Polymerase Chain Reaction – PCR).

Tablica 1. Naziv, podrijetlo, godina i rodoslovlje hrvatskih kultivara

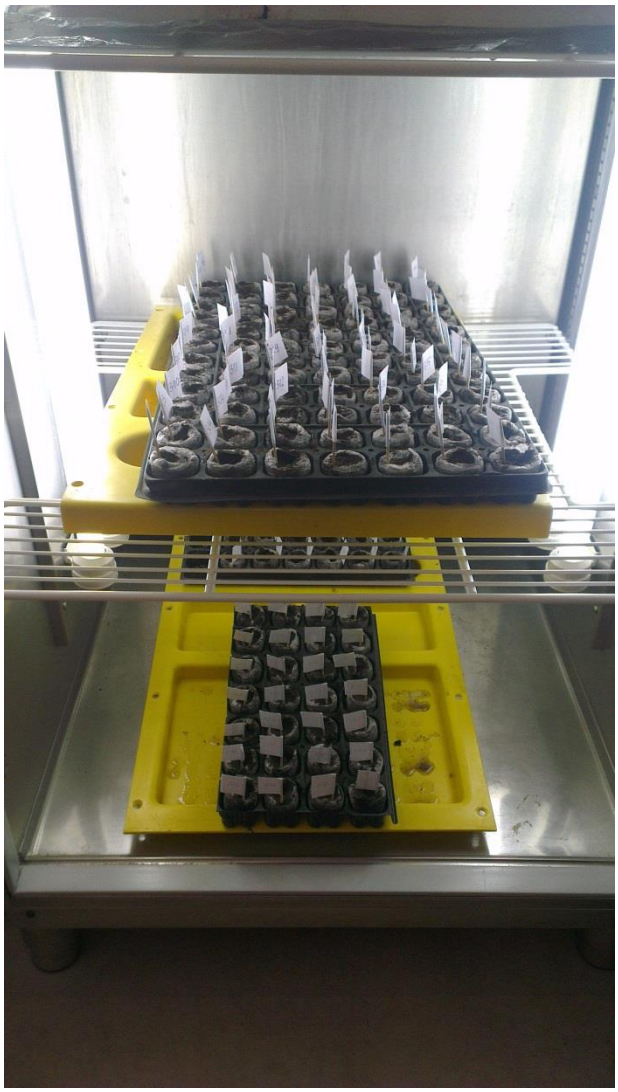
Br.	Kultivar	Podrijetlo	Godina	Rodoslovlje
1.	U1 (Osj. šišulja)	PIO	1936.	Carlotta strampelli/Marquis
2.	Osječka 20	PIO	1978.	Osk. 6.9-1-64/V-188-M
3.	Slavonija	PIO	1984.	Osječka 20/Osk 4.216-2-76
4.	Žitarka	PIO	1985.	Osk. 6.30-20/Slavonka/3/Eph. M68 / Osk. 154-19//Kavkaz
5.	Srpanjka	PIO	1989.	Osk. 4.50-1-77/Zg 2696
6.	Demetra	PIO	1989.	Osk. 4.216-2-76/Zg 2877-74
7.	Superžitarka	PIO	1997.	GO 3135 / Žitarka
8.	Zlatna Dolina	PIO	1971.	Zg 414-57 / Leonardo
9.	Golubica	PIO	1998.	Slavonija / Gemini
10.	Janica	PIO	2003.	Osk. 5.36-9-91 / Srpanjka
11.	Barbara	PIO	1997.	GO 3135 / Žitarka
12.	Nova Žitarka	PIO	2010.	FS 800/89 / Žitarka
13.	Sana	Bc Institut	1983.	Mura / CI 14123 // Zg 2413-72
14.	BC Elvira	Bc Institut	2002.	Bc 2377-79 / MV-C2-33 // Irena
15.	Adriana	Bc Institut	1988.	Zg 1758-70 / TpR-349
16.	Marija	Bc Institut	1988.	Zg 4527-68 / Kavkaz // Zg 1971-70
17.	Prima	Bc Institut	2001.	Sana / Gala
18.	Kuna	AFZ	1995.	St 563 / Skopljanka
19.	Cerera	Jošt sjeme	1993.	NE 7060 76Y335 / VG-19
20.	Koleda	Jošt sjeme	1998.	NE 7060 76Y335 / VG-19
21.	Divana	Jošt sjeme	1995.	Favorit /5/ Cirpiz /4/ J. Kwang /2/ Atlas66 / Comanc. /3/ Velvet
22.	Gabi	Agrigenetics	1999.	Srpanjka / GK 32-82
23.	Dea	Agrigenetics	2009.	Srpanjka / Brutus

Tablica 2. Naziv, podrijetlo, godina i rodoslovlje stranih kultivara

Br.	Kultivar	Podrijetlo	Godina	Rodoslovlje
1.	Kavkaz	Rusija	1972.	Lutescens-314-h-147/Bezostaya-1
2.	Florida	Njemačka	1985.	Caribo/Disponent
3.	Mv 14	Mađarska	1985.	Mir-808/Bez-1//Kavkaz/Rana-1//Zl.Dolina/Arthur
4.	Pesma	Srbija	1995.	NS-51-37/Balkan
5.	NS 602	Srbija	1972.	S-13, ITA/Aobakomugi
6.	Renesansa	Srbija	1995.	Yugoslavia/NS-55-25
7.	Sofija NS	Srbija	1998.	GKGRA-965-2/Panonija
8.	Sava	Srbija	1967.	Fortunato*2/(CI-13170)Redcoat
9.	NS Rana 1	Srbija	1975.	Bezostaya-1/NS-262//Mironovskaya-808/3/NS-435
10.	San Pastore	Italija	1940.	Balilla/Villa gloria
11.	Libellula	Italija	1965.	Tevere/Giuliari//San Pastore
12.	Mironovskaya 808	Ukrajina	1963.	(T)Artemovka
13.	Bankuty 1205	Mađarska	1931.	Marquis/Bankuti-5
14.	SW Maxi	Njemačka	2002.	-
15.	Chinese Spring	Kina	-	LV/Sichuan
16.	Golin	Švicarska	1994.	EXSR-400/Sonett/3/Sappo//B-580/B-664/4/EXSR-400/Selepek
17.	MV 18	Mađarska	-	Bezostaya-2/Krasnodarskii-Karlik-1

3.2.1. Uzgoj klijanaca

Sjeme svakog kultivara posijano je na tresetne pločice (Jiffy 7), koje su prethodno namočene u vodu. Uzorci sjemena su naklijavani u klima komori tijekom 14 dana (slika 1). Temperatura u klima komori održavana je na 20°C uz svjetlosni režim 12 sati osvjetljenja i 12 sati tame, uz redovito zalijevanje. Listovi biljaka prikupljeni su u fazi dva do tri lista, pohranjeni u vrećice s pripadajućim brojem kultivara te pohranjeni u zamrzivač na -80°C.



Slika 1. Sjeme posijano u tresetne pločice u klima komori (foto original; J. Puškarić)

3.2.2. Izolacija genomske DNA

Izolacija DNA iz listova odabranih kultivara provedena je prema cetil-trimetil-amonij-bromid metodi (CTAB) (Doyle i Doyle, 1987., modificiranoj prema Grljušić, 2003.) Odvagano je 20 mg odrezanih listova koji su stavljeni u tarionike prethodno ohlađene tekućim dušikom. Listovi su zatim preliveni tekućim dušikom i tučkom smrvljeni u fini prah. U svaki uzorak pipetom je dodano 1000 µl 2% CTAB pufera (1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 Na_2EDTA pH 8.0, 5M NaCl, 10% SDS), koji je prethodno zagrijan na 68°C u vodenoj kupelji. Sadržaj iz tarionika prenesen je u označene Eppendorf tubice od 2 ml koje su zatim

kratko vorteksirane te inkubirane na 65°C u vodenoj kupelji 45 minuta. Set tubica je povremeno okretan rukom.

Nakon inkubacije uzorci u tubicama premješteni su u posudu s ledom gdje je svakom uzorku dodano 670 µl SEVAG-a (kloroform izoamilni alkohol). Nakon dodavanja alkohola svaki je uzorak pojedinačno protresen rukom okretanjem tubice te su tubice stavljene 30 minuta na stalak za mućkanje (slika 2). Tubice su zatim stavljene na centrifugiranje 8 minuta na brzinu od 14 000 okretaja/min (slika 3).



Slika 2. Uzorci na stalku za mućkanje (foto original; J. Puškarić)

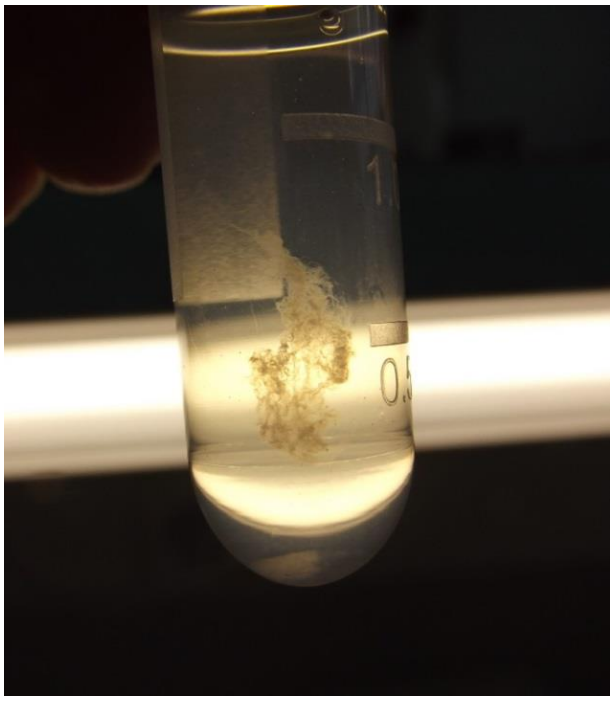


Slika 3. Uzorci spremljeni za centrifugiranje (foto original; J. Puškarić)

Centrifugiranjem je odvojena tekuća faza (oko 750 µl) od krute faze (slika 4) koja je zatim pipetom s odrezanim vrhom izdvojena u novooznačeni set tubica od 2 ml. U svaku tubicu dodano je 16 µl enzima RNAze te su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi uz konstantno mućkanje u trajanju od 30 minuta, uz povremeno okretanje rukom. Nakon toga u svaku je tubicu dodano 650 µl 0,7 V hladnog izopropanola, nakon čega su uzorci lagano okretani dok DNA nije postala vidljiva (slika 5).



Slika 4. Odvajanje tekuće od krute faze (foto original; J. Puškarić)



Slika 5. Vidljiva DNA (foto original; J. Puškarić)

Tubice s izopropanolom su ostavljene na sobnoj temperaturi dva sata uz povremeno okretanje rukom nakon čega su centrifugirane jednu minutu na 14 000 o/min. Nakon centrifugiranja na dnu tubice se formirala bijela peleta DNA. Tekuća faza je pažljivo izlivena kako se ne bi izgubila bijela peleta. U tubice je zatim dodano 500 µl 0,2 mM natrij acetata u 76% etanolu kojim je peleta prana 30 minuta laganim treskanjem tubica. Tubice su zatim centrifugirane 2 minute na 14 000 o/min te je tekućina iznad peleta opet pažljivo izlivena. Pranje peleta ponovljeno je s 500 µl amonij acetata u 76% etanolu tijekom 10 minuta. Tubice su ponovo stavljene na centrifugu jednu minutu na 14 000 o/min te je tekuća faza opet izlivena. Nakon izlijevanja tekuće faze ostatak etanola iz svake tubice je pažljivo odstranjen pipetom, a tubice su zatim ostavljene otvorene u digestoru od 30 do 45 minuta. Nakon sušenja, peletama je dodano 100 µl 1 x TE pufera kako bi se otopile, zatim su tubice kratko centrifugirane i pohranjene na + 4°C. Sljedeći dan uzorci DNA su pohranjeni na – 20°C.

3.2.3. Provjera čistoće i kvalitete DNA

Provjera čistoće DNA provodi se mjerenjem apsorbance izolirane DNA na dvije valne duljine, 260 i 280 nm. Čistoća izolirane DNA provjerena je na Varian Cary® 50 UV-Visible spektrofotometru. Razrjeđenja DNA pripremljena su dodavanjem 15 µl čiste DNA i 735 µl TE pufera. Na početku mjerenja uređaj je kalibriran pomoću d.d. H_2O (slijepa proba). Za svaki uzorak napravljena su dva ponavljanja te je na temelju omjera apsorbanci A_{260} (260 nm) i A_{280} (280 nm) utvrđena čistoća DNA, čija je vrijednost bila prihvatljiva u rasponu od 1,7 do 2,0 za omjer A_{260}/A_{280}. Kvaliteta DNA provjerena je i elektroforezom u usporedbi s λ DNA, čija je koncentracija unaprijed poznata. Pripremljen je 0,75% agarozni gel u 1 x TAE puferu na koji su naneseni uzorci. Za pripremu uzoraka za elektroforezu korišteno je 3 µl razrijeđene DNA, 2 µl STOP mixa (5x SGB) (1M Tris-HCl pH 8,0, 0,5M Na_2EDTA, Bromfenolblue boja, 87% glicerin, SDS) i 2 µl d.d. H_2O. Uvjeti elektroforeze bili su: 80 V, 60 mA i 50 W.

Uzorci DNA za koje je utvrđena nezadovoljavajuća čistoća te loša kvaliteta spektrofotometrijskom analizom ponovo su izolirani.

Na temelju izmjerenih vrijednost apsorbanci, određena je i koncentracija DNA u ng/µl prema sljedećoj formuli:

$$[DNA] = A_{260} * A_{280} * 50^2$$

Nakon određivanja koncentracije pripremljeni su radni uzorci za PCR reakcije na način da je za svaki pojedini uzorak izračunata količina DNA i TE pufera za PCR razrjeđenje 1:5 (tablica 3) prema formulama:

$$DNA\ (\mu L) = \frac{20}{[DNA]} * 50^2$$

$$TE\ 8.0\ (\mu l) = 50 - DNA\ (\mu l)$$

Tablica 3. Koncentracija DNA i PCR razrjeđenja

Br.	Kultivar	[DNA] ng/µl	PCR razrjeđenje 1:5 (µl)		Br.	Kultivar	[DNA] ng/µl	PCR razrjeđenje 1:5 (µl)	
			DNA	TE 8,00				DNA	TE 8,0
1.	Kavkaz	562,8	1,78	48,22	**21.**	Kuna	606,5	1,65	48,35
2.	Florida	897,3	1,11	48,89	**22.**	Cerera	573,3	1,74	48,26
3.	Mv 14	410,0	2,44	47,56	**23.**	Koleda	566,0	1,77	48,23
4.	U1	335,5	2,98	47,02	**24.**	Divana	622,5	1,61	48,39
5.	Osječka 20	241,5	4,14	45,86	**25.**	Gabi	910,3	1,10	48,90
6.	Slavonija	470,5	2,13	47,87	**26.**	Dea	711,3	1,41	48,59
7.	Žitarka	680,75	1,47	48,53	**27.**	Pesma	235,5	4,25	45,75
8.	Srpanjka	333,33	3,00	47,00	**28.**	NS 602	435,8	2,29	47,71
9.	Demetra	249,8	4,00	46,00	**29.**	Renesansa	373,8	2,68	47,32
10.	Superžitarka	423,8	2,36	47,64	**30.**	Sofija NS	718,3	1,39	48,61
11.	Zlatna Dolina	141,5	7,07	42,93	**31.**	Sava	338,8	2,95	47,05
12.	Golubica	445,5	2,24	47,76	**32.**	NS Rana 1	615,8	1,62	48,38
13.	Janica	640,5	1,56	48,44	**33.**	San Pastore	267,8	3,73	46,27
14.	Barbara	357,0	2,80	47,20	**34.**	Libellula	520,0	1,92	48,08
15.	Nova Žitarka	783,5	1,28	48,72	**35.**	Mironovskaya 808	780,0	1,28	48,72
16.	Sana	834,25	1,20	48,80	**36.**	Bankuty 1205	825,8	1,21	48,79
17.	BC Elvira	401,75	2,49	47,51	**37.**	SW Maxi	671,8	1,49	48,51
18.	Adriana	281,75	3,55	46,45	**38.**	Chinese Spring	1414,5	0,71	49,29
19.	Marija	847,8	1,18	48,82	**39.**	Golin	458,3	2,18	47,82
20.	Prima	508,50	1,97	48,03	**40.**	Mv 18	970,5	1,03	48,97

3.2.4. PCR analiza

Za PCR analizu prisutnosti Vrn-A1a, Vrn-A1b, Vrn-A1c, vrn-A1 te Vrn-B1, vrn-B1, Vrn-B3, vrn-B3 i Vrn-D1, vrn-D1 gena korišteno je nekoliko molekularnih markera. Sekvence parova početnica prikazane su u tablici 4. Prije pripreme reakcijskih smjesa za PCR analizu napravljena su razrjeđenja oligonukleotidnih početnica dodavanjem TE pufera prema istoj tablici. Zatim je u tubice od 0,5 ml dodano 10 µl razrijeđenih početnica i 100 µl d.d H_2O. Tubice su čuvane na -20°C.

Amplifikacija mikrosatelitnih početnica obavljena je prema MAS Wheat protokolu (http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Vrn/). Prije amplifikacije pristupilo se optimiziranju PCR reakcija kroz promjene temperaturnih uvjeta reakcija kao i odabir koncentracije i količine amplifikacijskih reagensa. Reakcijska smjesa za PCR analizu sadržavala je amplifikacijske reagense, početnice i genomsku DNA. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa bili su jednaki za većinu markera, a prikazani su u Tablici 5.

Tablica 4. Sekvence i razrjeđenja korištenih početnica

Početnice	**Sekvence početnica (5' → 3')**	**TE pH 8.00 (µl)**
VRN1A_L	F: GAA AGG AAA AAT TCT GCT CG	93
VRN1-INT1_R	R: GCA GGA AAT CGA AAT CGA AG	89
Intr1/C/F	F: GCA CTC CTA AAC CAC TAA CC	166
Intr1/AB/R	R: TCA TCC ATC ATC AAG GCA AA	213
Intr1B_L	F: CAA GTG GAA CGG TTA GGA CA	93
Intr1B_R3	R: CTC ATG CCA AAA ATT GAA GAT GA	77
Intr1B_R4	R: CAA ATG AAA AGG AAT GAG AGC A	81
VRN3_BINS_L	F: CAT AAT GCC AAG CCG GTG AGT AC	86
VRN3_BINS_R	R: ATG TCT GCC AAT TAG CTA GC	104
VRN3_BNOINS_L	F: ATG CTT TCG CTT GCC ATC C	124
VRN3_BNOINS_R	R: CTA TCC CTA CCG GCC ATT AG	112
Intr1D_L	F: GTT GTC TGC CTC ATC AAA TCC	106
Intr1D_R3	R: GGT CAC TGG TGG TCT GTG C	116
Intr1D_R4	R: AAA TGA AAA GGA ACG AGA GCG	81

Tablica 5. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR amplifikaciju svih korištenih početnica (osim VRN1A_L i VRN1-INT1_R)

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji (10 µl)**	**Volumen za 40 reakcija**
	Ishodišna	**Radna**		
PCR pufer	5x	1x	2	80
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,6	24
dNTP mix	2,5 mM	0,2 mM	0,8	32
F – početnica	10 µl	0,5 mM	0,5	20
R – početnica	10 µl	0,5 mM	0,5	20
Taq polimeraza	5 U/ µl	0,05 U/ µl	0,1	4
Genomska DNA	3 µl		3	3
d.d. H_20			4,41	176,4
Ukupno			10	356,4 + DNA

Koncentracije se razlikuju samo kod VRN1A_L i VRN1-INT1_R, gdje se stavlja 0,1 µl od obje početnice te je volumen d.d H_2O 3,61 po jednoj reakciji. Za 40 reakcija volumen iznosi 4 µl od svake početnice te 144,4 µl d.d. H_20.

Za PCR analizu korišten je uređaj Eppendorf Mastercycler® Thermal Cyclers 53333 Version 20.30.33-09. Programi su navedeni u tablicama kako slijedi:

Tablica 6. PCR program za VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnice

PCR program:

1. Korak	95°C	3 min	
2. Korak	94°C	45'	30 x
	60°C	60'	
	72°C	90'	
3. Korak	72°C	5 min	

Očekivani produkt amplifikacije VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnicama bili su fragmenti dužine 965 pb ili 876 pb za *Vrn-A1a*, 714 pb za *Vrn-A1b*, te 734 pb za dominantni *Vrn-A1c* i recesivni *vrn-A1*. Elektroforeza je rađena u 2%-tnom agaroznom gelu.

Tablica 7. PCR program za Intr1/C/F i Intr1/AB/R početnice

PCR program:

1. Korak	94°C	4 min	
2. Korak	94°C	15'	30 x
	65°C	45'	
	72°C	45'	
3. Korak	72°C	5 min	

Fragmenti dužine 1060 pb bili su očekivani produkt amplifikacije Intr1/C/F i Intr1/AB/R početnicama za recesivni *vrn-A1*, dok se za dominantni *Vrn-A1* produkt ne očekuje. Elektroforeza je rađena u 1%-tnom agaroznom gelu.

Tablica 8. PCR program za Intr1B_L i Intr1B_R3 početnice

PCR program:

1. Korak	94°C	4 min	
2. Korak	94°C	15'	30 x
	65°C	45'	
	72°C	45'	
3. Korak	72°C	5 min	

Očekivani produkti amplifikacije Intr1B_L i Intr1B_R3 za dominantni *Vrn-B1* iznosi 709 pb, dok se *vrn-B1* ne amplificira. Elektroforeza je rađena na 1%-tnom agaroznom gelu.

Tablica 9. PCR program za Intr1B_L i Intr1B_R4 početnice

PCR program: TOUCHDOWN3

95°C	5 min	
95°C	45'	8x
68°C	60'	
72°C -1-00° R=0.3°/s	80' +1.00' +0.1°/s	
94°C	15'	31x
58°C	15'	
72°C	50'	
72°C	2 min	
Vrn_B1	0	
vrn_B1	1140	

Očekivani produkti amplifikacije Intr1B_L i Intr1B_R4 su obrnuti nego u prethodno spomenutim početnicama (Intr1B_L i Intr1B_R3), dominantni *Vrn-B1* se ne amplificira, za recesivni *vrn-B1* se očekuje produkt od 1149 pb. Elektroforeza je rađena na 1%-tnom agaroznom gelu.

Tablica 10. PCR program za VRN3_BINS_L i VRN3_BINS_R početnice

PCR program:

1. Korak	95°C	3 min	
2. Korak	94°C	45'	30 x
	60°C	60'	
	72°C	90'	
3. Korak	72°C	5 min	

Fragment dužine 1200 pb bio je očekivan kod VRN3_BINS_L i VRN3_BINS_R početnica za dominantne alele *Vrn-B3* na koromosomu B, te bez produkta za recesivni *vrn-B3*. Elektroforeza je rađena na 1%-tnom agaroznom gelu.

Tablica 11. PCR program za VRN3_BNOINS_L i VRN3_BNOINS_R početnice

PCR program: TOUCHDOWN3

95°C	5 min	
95°C	45'	8x
68°C	60'	
72°C -1-00° R=0.3°/s	80' +1.00' +0.1°/s	
94°C	15'	31x
58°C	15'	
72°C	50'	
72°C	2 min	
Vrn_B1	0	
vrn_B1	1140	

VRN3_BNOINS_L i VRN3_BNOINS_R početnice režu DNA na fragmente duljine 1140 pb za recesivne *vrn-B3* alele na B3 lokusu. Dominantni *Vrn-B3* nema produkta, a elektroforeza je rađena na 1%-tnom agaroznom gelu.

Tablica 12. PCR program za Intr1D_L i Intr1D_R3 početnice

PCR program:

1. Korak	95°C	3 min	
2. Korak	95°C	45'	30 x
	60°C	60'	
	72°C	70'	
3. Korak	72°C	5 min	

Na D kromosomu početnicama Intr1D_L i Intr1D_R3 očekuje se dominantni alel *Vrn-D1* dug 1671 pb, dok se recesivni *vrn-D1* ne očekuje. Elektroforeza je i ovdje rađena na 1%-tnom agaroznom gelu.

Tablica 13. PCR program za Intr1D_L i Intr1D_R4 početnice

PCR program:

1. Korak	94°C	5 min	
2. Korak	94°C	30'	38 x
	60°C	30'	
	72°C	100'	
3. Korak	72°C	10 min	

Za razliku od Intr1D_L i Intr1D_R3 početnica, Intr1D_L i Intr1D_R4 početnice amplificiraju produkt za recesivni *vrn-D1* od 997 pb, dok se dominantni *Vrn-D1* ne očekuje. Elektroforeza je rađena na 1%-tnom agaroznom gelu.

3.2.5. Elektroforeza

Produkti PCR analize naneseni su na 1% (ili 2% za VRN1A_L, VRN1-INT1_R) agarozni gel u 1 x TBE puferu radi razdvajanja i daljnje analize. Gel je bio veličine 7 x 10 x 1 cm, priređen na sljedeći način: u Erlenmayer tikvicu od 200 ml odvagano je 0,6 g agaroze Lonza SeaKem® te je dodano 60 ml 1x TBE pufera za 1% gel. Za 2% gel dodano je duplo više agaroze (1,2 g). Tikvica je zagrijavana u mikrovalnoj pećnici oko dvije minute do vrenja, tijekom čega je nekoliko puta izvađena i lagano miješana, kako bi se pospješilo otapanje agaroze. Nakon toga je ohlađena laganim miješanjem u vodenoj kupelji na temperaturu od oko 60°C. Toj otopini agaroze dodane su 2-3 kapi fluorescentne Olerup SPP® GelRed boje kako bi fragmenti DNA bili vidljivi na gelu. Sadržaj je izliven u prethodno priređenu kadicu u kojoj su smještena dva češlja od 15 jažica, nakon čega je gel ostavljen da se ohladi na sobnoj temperaturi dok se ne polimerizira (oko 30 minuta za 1% i 20 minuta za 2% gel). Nakon polimerizacije izvađeni su češljići (slika 6).



Slika 6. Uređaj za elektroforezu i kadica s agaroznim gelom (foto original; J. Puškarić)

Gel je postavljen u uređaj za elektroforezu, Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT, uronjen u 1 x TBE pufer. U svaku jažicu pipetom je nanesen po jedan uzorak u količini od 5 µl. Kao standard za utvrđivanje veličine fragmeneta PCR produkata korišten je DNA standard („ljestve“), Promega® 100 pb „Ladder“ s rasponom veličine fragmeneta od 100 do 1500 pb, zajedno s pripadajućom bojom, 6x Blue/Orange Loading Dye. Za dva uzorka „ljestvi“ koristilo se 1 µl DNA standarda, 1,7 µl boje, te 7,4 µl TE pufera. Nakon što je uređaj spojen na izvor električne energije podešen je na 60 V, 40 mA i 20 W te pušten u rad. Uvjeti su se razlikovali kod nekih početnica, kao i dužina trajanja elektroforeze, koja je u prosjeku trajala 1 h (za početnice VRN1A_L, VRN1-INT1_R elektroforeza je trajala 4h).

3.2.6. Očitavanje rezultata

Slike agaroznog gela s PCR produktima nakon završene elektroforeze dobivene su pomoću Syngene® G:BOX F3 uređaja. Uređaj u sebi ima ugrađenu kameru rezolucije 3,8 megapixela, te GeneSys softver. Rezultati su očitani pomoću Syngene® programa GeneTools kompatibilnim s GeneSys softverom ver 1.4.1.0 (slika 7).



Slika 7. G:BOX uređaj za snimanje gela (foto original; J. Puškarić)

4. Rezultati

Nakon slikanja gelova slike su obrađene, a pomoću Syngene® GeneTools programa identificirani su dobiveni produkti PCR reakcija tj. različiti *Vrn* aleli (tablica 14 i 15) na gen lokusima *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* i *Vrn-D* u 23 hrvatska i 17 stranih kultivara.

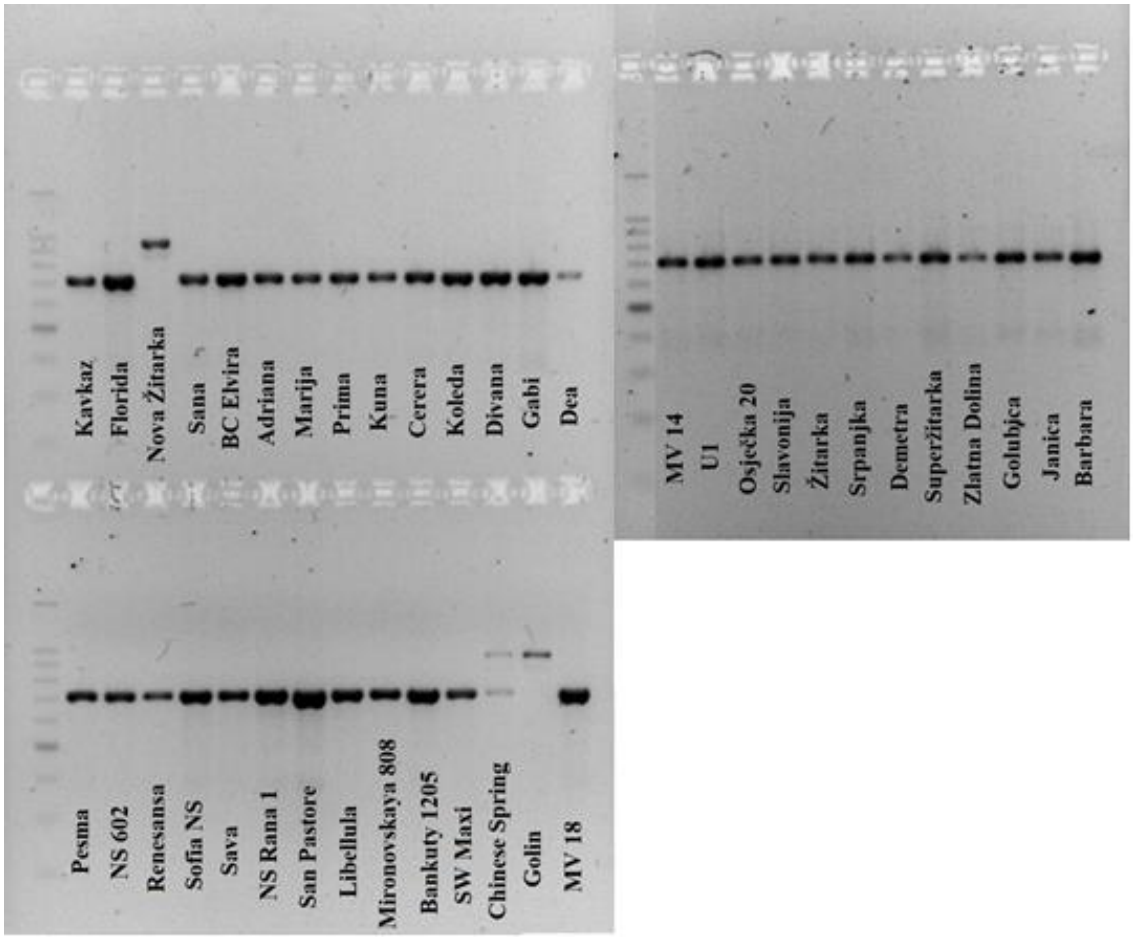
Tablica 14. Varijabilnost alela *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* i *Vrn-D* gen lokusa u 23 hrvatska kultivara

Br.	Kultivar	Vrn-A1a	Vrn-A1b Vrn-A1c vrn-A1	vrn-A1	vrn-B1	vrn-B3	Vrn-D1	vrn-D1
1.	U1		+	+	+	+		+
2.	Osječka 20		+	+	+			+
3.	Slavonija		+	+		+		+
4.	Žitarka		+		+	+		+
5.	Srpanjka		+	+	+	+		+
6.	Demetra		+	+	+	+		+
7.	Superžitarka		+	+	+	+		+
8.	Zlatna Dolina		+	+		+		+
9.	Golubica		+	+	+	+		+
10.	Janica		+	+	+	+		+
11.	Barbara		+	+		+		+
12.	Nova Žitarka	+			+	+		+
13.	Sana		+		+	+		+
14.	BC Elvira		+	+	+	+		+
15.	Adriana		+		+	+		+
16.	Marija		+		+	+		+
17.	Prima		+		+	+		+
18.	Kuna		+	+	+	+		+
19.	Cerera		+		+	+		+
20.	Koleda		+	+	+	+		+
21.	Divana		+	+	+	+		+
22.	Gabi		+	+	+	+		+
23.	Dea		+	+	+	+		+

Tablica 15. Varijabilnost alela *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* i *Vrn-D* gen lokusa u 17 stranih kultivara

Br.	Kultivar	Vrn-A1a	Vrn-A1b Vrn-A1c vrn-A1	vrn-A1	vrn-B1	vrn-B3	Vrn-D1	vrn-D1
1	Kavkaz		+	+	+	+		+
2	Florida		+	+	+	+		
3	Mv 14		+	+	+	+		+
4	Pesma		+	+	+	+		+
5	NS 602		+	+	+	+		+
6	Renesansa		+	+	+	+		+
7	Sofija NS		+	+	+	+		+
8	Sava		+	+	+	+		
9	NS Rana 1		+	+	+	+		+
10	San Pastore		+	+	+	+		+
11	Libellula		+	+	+	+		+
12	Mironovskaya 808		+	+	+	+		+
13	Bankuty 1205		+	+	+	+		+
14	SW Maxi		+	+	+	+		+
15	Chinese Spring	+	+	+	+	+	+	
16	Golin	+		+		+		+
17	MV 18		+	+	+	+		+

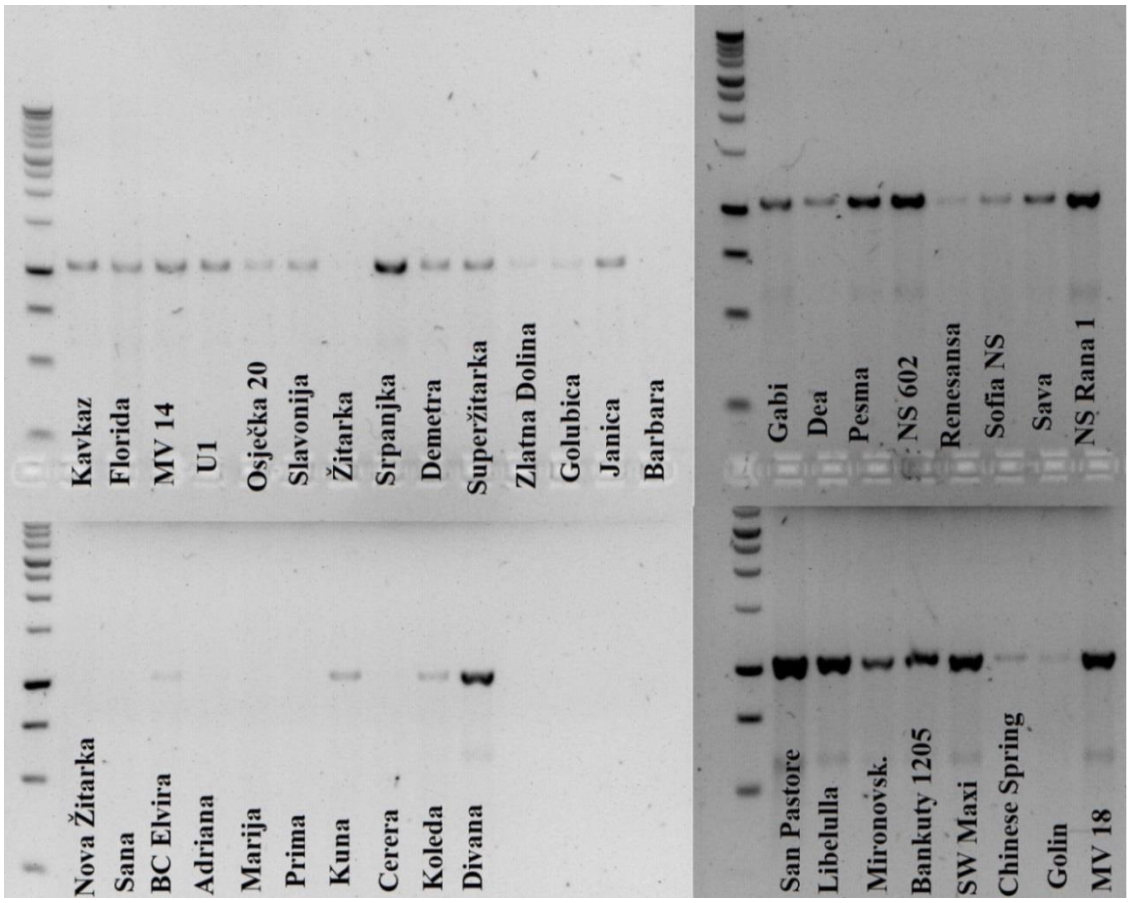
Kultivari u kojima je prisutnost određenih alela utvrđena korištenjem VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnica, dali su produkte amplifikacije od 965 (876) pb za *Vrn-A1a* alel, 714 pb za *Vrn-A1b* te 734 pb za dominantni *Vrn-A1c* i recesivni *vrn-A1*. Od ukupno 40 istraživanih kultivara pšenice korištenjem tih početnica, *Vrn-A1a* alel je utvrđen u tri kultivara (tablica 14 i 15). Od ta tri kultivara samo je jedan hrvatskog podrijetla i to Nova Žitarka, a dva su stranog podrijetla, Chinese Spring i Golin. Ostali aleli, *Vrn-A1b*, *Vrn-A1c* i *vrn-A1* (od 714 i 734 pb) pronađeni su u 22 hrvatska kultivara, osim kultivara Nove Žitarke koja ima *Vrn-A1a* alel, te u 16 kultivara stranog podrijetla, osim kultivara Golin koji kao i Nova Žitarka ima samo *Vrn-A1a* alel (slika 8).



Slika 8. Produkti PCR amplifikacije VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnica

(foto original; J. Puškarić)

Za razlikovanje dominantnog *Vrn-A1c* od recesivnog *vrn-A1* koji su imali isti broj baznih parova s početnicama od prije navedenih (VRN1A_L i VRN1-INT1_R) korištene su početnice Intr1/C/F, Intr1/AB/R. Očekivani produkti te amplifikacije bili su oko 1060 (1068) pb za recesivni *vrn-A1* (slika 9). Od ukupno 40 ispitivanih kultivara pšenice taj recesivni *vrn-A1* alel pronađen je u 33 kultivara (tablice 14 i 15). Između 23 hrvatska kultivara pšenice *vrn-A1* alel je pronađen u 16 kultivara, u sedam kultivara nije utvrđen i to u kultivarima Žitarka, Nova Žitarka, Sana, Adriana, Marija, Prima i Cerera. U svih 17 stranih kultivara pronađen je recesivni alel *vrn-A1*.



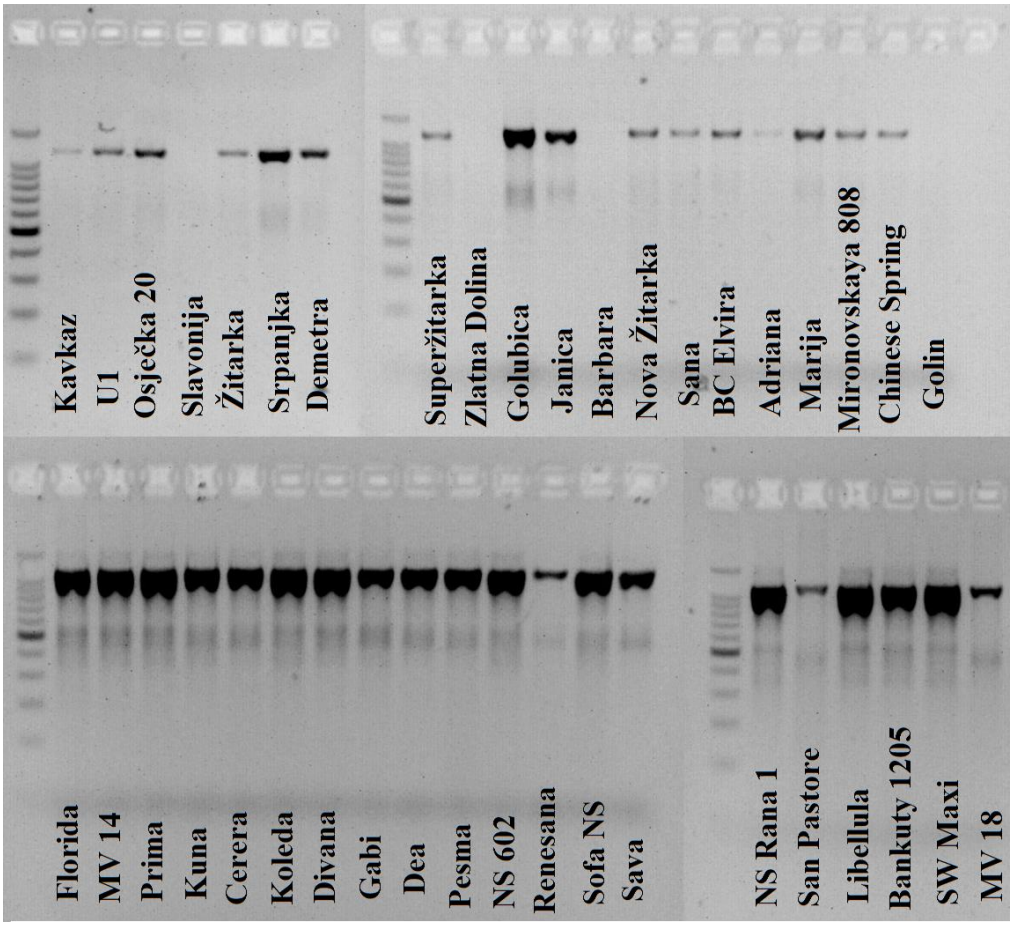
Slika 9. Produkti PCR amplifikacije Intr1/C/F, Intr1/AB/R početnica

(foto original; J. Puškarić)

Uspoređujući rezultate korištenih početnica za lokus *Vrn-A1*, 16 kultivara je dalo rezultate s tim početnicama i to kultivari U1, Osječka 20, Slavonija, Srpanjka, Demetra, Superžitarka, Zlatna Dolina, Golubica, Janica, Barbara, BC Elvira, Kuna, Koleda, Divana, Gabi i Dea. Što znači da od 22 kultivara utvrđena VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnicama imaju recesivni *vrn-A1* utvrđen i Intr1/C/F i Intr1/AB/R početnicama. Ostalih 6 kultivara dokazanih VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnicama (od 22 pronađena) su ili *Vrn-A1b* (714 pb) ili *Vrn-A1c* (734 pb) i to Žitarka, Sana, Adriana, Marija, Prima i Cerera. U stranim kultivarima svi rezultati ukazuju na postojanje samo recesivnog *vrn-A1* alela.

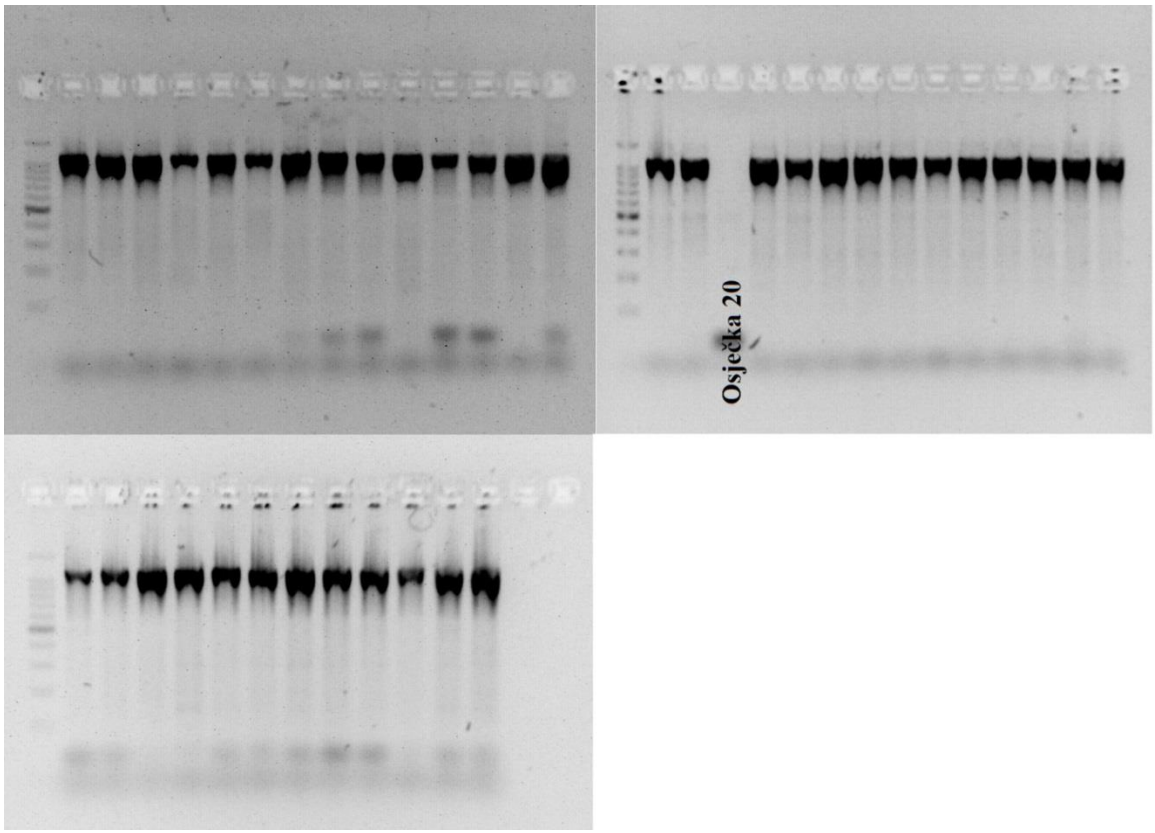
Kultivari u kojima je prisutnost recesivnog *vrn-B1* alela utvrđena Intr1B_L i Intr1B_R4 početnicama dali su očekivane produkte amplifikacije od 1149 pb (slika 10). Od ukupno 40

ispitanih kultivara pšenice, recesivni *vrn-B1* alel pronađen je u 36 njih (tablica 14 i 15). Među 23 hrvatska kultivara pšenice *vrn-B1* alel je pronađen u 20 njih, dok u kultivarima Slavonija, Zlatna Dolina i Barbara nije pronađen. Od 17 stranih kultivara samo u kultivaru Golin nije utvrđen.



Slika 10. Produkti PCR amplifikacije Intr1B_L i Intr1B_R4 početnica
(foto original; J. Puškarić)

Kultivari u kojima je prisutnost recesivnog *vrn-B3* alela utvrđena VRN3_BNOINS_L i VRN3_BNOINS_R početnicama dali su očekivane produkte amplifikacije od 1140 pb (slika 11). Od ukupno 40 ispitanih kultivara pšenice, recesivni *vrn-B3* alel pronađen je u njih 39 (tablica 14 i 15). Među 23 hrvatska kultivara pšenice *vrn-B1* alel je pronađen u njih 22, samo u kultivara Osječka 20 nije pronađen. Od 17 stranih kultivara pšenice u svim je utvrđen recesivni *vrn-B3* alel.

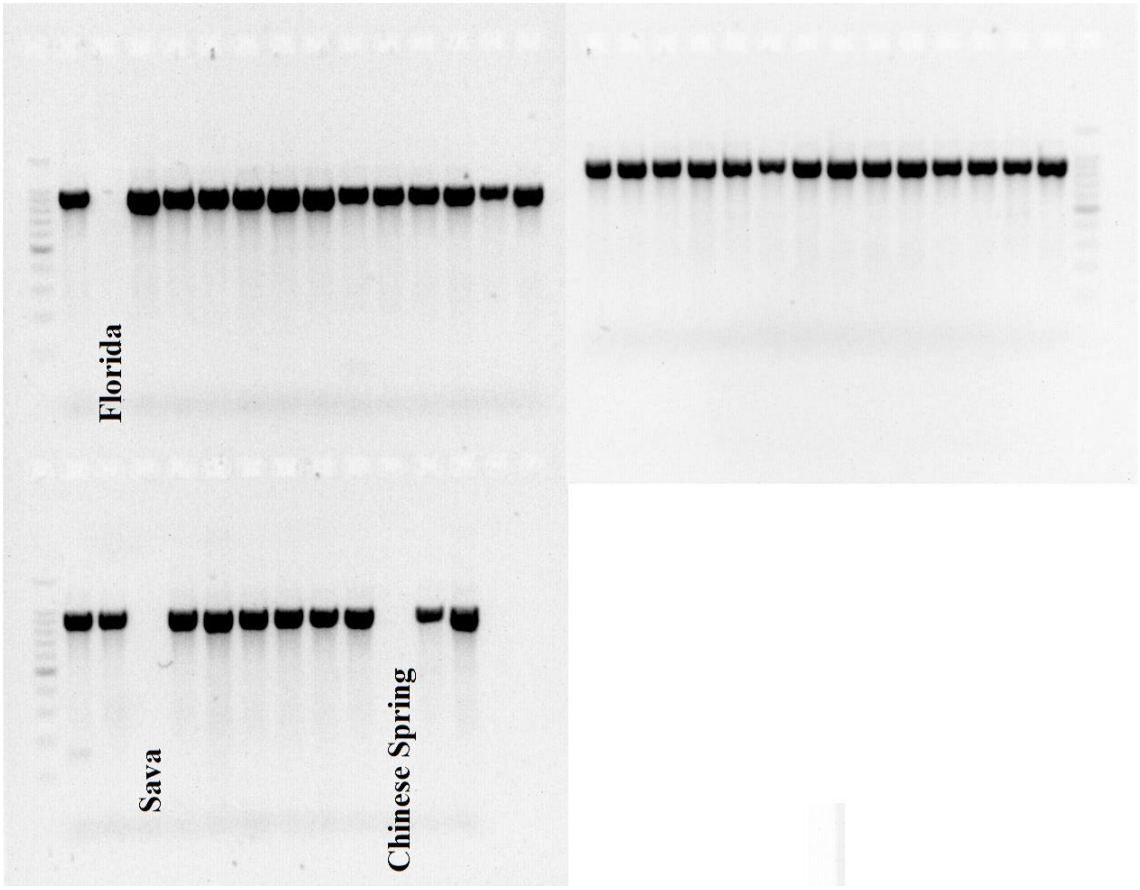


Slika 11. Produkti PCR amplifikacije VRN3_BNOINS_L i VRN3_BNOINS_R početnica

(foto original; J. Puškarić)

Kultivari u kojima je prisutnost dominantnog *Vrn-D1* alela utvrđena korištenjem Intr1D_L i Intr1D_R3 početnica, dali su produkte amplifikacije od 1671 pb. Od 40 ispitanih kultivara dominantni alel *Vrn-D1* na *Vrn-D1* lokusu pronađen je samo u jednom kultivaru. U niti jednom hrvatskom kultivaru nije pronađen *Vrn-D1* alel, dok je od 23 strana kultivara *Vrn-D1* alel pronađen samo u jednom kultivaru i to u Chinese Spring.

Kultivari u kojima je prisutnost recesivnog *vrn-D1* alela utvrđena Intr1D_L i Intr1D_R4 početnicama dali su očekivane produkte amplifikacije od 997 pb (slika 12). Od ukupno 40 ispitanih kultivara pšenice, recesivni *vrn-D1* alel pronađen je u 37 njih (tablica 14 i 15). Alel *vrn-D1* pronađen u svim hrvatskim kultivarima. Od 17 stranih kultivara pšenice pronađen je u 14 njih, dok u kultivarima Florida, Sava i Chinese Spring nije pronađen.



Slika 12. Produkti PCR amplifikacije Intr1D_L i Intr1D_R4 početnica

(foto original; J. Puškarić)

Amplifikacija Intr1A_L2, IntrA1_R3 i Intr1B_L, Intr1B_R3 te VRN3_BINS_L, VRN3_BINS_R početnica nije dala rezultate.

5. Rasprava

Informacije o *Vrn* alelima su važne zbog tolerancije na mraz i niske temperature u žitarica. Pojava *Vrn* alela opisana je u mnogih kultivara pšenice iz različitih krajeva svijeta. U ovom istraživanju smo utvrđivali prisutnost *Vrn-1* te *Vrn-3* lokusa krušnih kultivara pšenica iz Hrvatskog registra. Takva istraživanja do sad nisu obavljena na hrvatskim kultivarima.

Prema Stelmakh (1987.), ozimi heksaplodni kultivari pšenice su homozigoti za recesivne alele na sva tri proučavana *Vrn-1* lokusa te sukladno tome i na *Vrn-B3 lokusu*. Međutim, noviji radovi pokazali su da u nekim slučajevima dominantni *Vrn-B1* ili *Vrn-D1* alel nije dovoljan kako bi utvrdio jari tip pa te biljke zahtijevaju niske temperature; takvi kultivari su opisani kao fakultativni tip (Sun i sur., 2009.). Razina *Vrn-1* transkripcije je glavni čimbenik koji određuje početak klasanja kod pšenice (Distelfeld i sur 2009; Dhillon i sur., 2010.). Do inhibicije klasanja dolazi kada je razina transkripta vjerojatno preniska unatoč pojavi dominantnog *Vrn* alela. Pretpostavlja se da su neki proučavani hrvatski kultivari fakultativni, no da bi se točno odredilo bila bi potrebna sjetva sa jarim kultivarima.

Yan i sur. (2004.) su proučavali dominantan *Vrn-A1* alel u 26 kultivara krušne pšenice (*Triticum aestivum* L.), te su detaljnom analizom pronašli je *Vrn-A1a* alel u 18 kultivara, a *Vrn-A1b* alel u njih šest. U ostala dva kultivara, IL369 iz Afganistana i IL162 iz Egipta, identificiran je novi alel *Vrn-A1c*. Kasnije su ti autori analizirali *Vrn-A1* lokus na 200 kultivara heksaploidne pšenice, 68 ozima i 132 jara kultivara. U svih ispitanih ozimih kultivara potvrdili su prisutnost recesivnog *vrn-A1* alela. U 55% jarih kultivara utvrđen je *Vrn-A1a* alel, a samo u 6% *Vrn-A1b* alel. U preostalim kultivarima bio je pronađen recesivni *vrn-A1* alel. U hrvatskim ozimim kultivarima učestalost recesivnog *vrn-A1* alela bila je 69,6%, a 26,1% za *Vrn-A1b alel.*

Fu i sur. (2005.) istraživali su *Vrn-1* lokus u 117 jarih kultivara pšenice (priznati kultivari Argentine i Kalifornije). U 56,5% kultivara pronađen je dominantni *Vrn-A1* alel, dok je *Vrn-D1* alel pronađen u 42%, bez obzira na regiju podrijetla. U 66,1% argentinskih kutivara utvrđen je *Vrn-B1* alel, dok je učestalost istog alela u kalifornijskim kultivarima iznosila 49,1%. U 48,4% ispitivania kultivara, najčešća kombinacija alela bila je *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*. U hrvatskom sortimentu na *Vrn-B1* lokusu, u 87% kultivara bio je

pronađen recesivni *vrn-B1* alel, a najčešća kombinacija bila je kombinacija recesivnih alela *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-B3* i *vrn-D1*, i to u 52,2% kultivara.

Iqbal i sur. (2007.) analizirali su 40 jarih kultivara iz zapadne Kanade. Istraživanjem su utvrdili dominantni *Vrn-A1a* alel u 34 kultivara. Alel *Vrn-A1b* identificiran je samo u kultivaru Rescue i njegove supstitucijske linije RC5D. Četiri analizirana kultivara posjedovali su recesivni *vrn-A1* alel. Dominantni alel *Vrn-B1* lokusa zabilježen je u pola analiziranih kultivara, dok dominantni *Vrn-A1c* i *Vrn-D1* aleli nisu pronađeni ni u jednom kultivaru. U ovom istraživanju pronađen je samo jedan dominantni *Vrn-D1*, i to u stranom kultivaru Chinese Spring, dok je recesivni *vrn-D1* alel pronađen u 62,5% proučavana kultivara i to u 12 hrvatskih i 13 stranih.

Za procjenu varijabilnosti kultivara na *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3*, te *Vrn-D1* lokusima korišteni su specifični mikrosatelitni markeri za *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3*, te *Vrn-D1* gene. Rezultati ovog istraživanja varijabilnosti na *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3*, te *Vrn-D1* lokusima 23 kultivara hrvatske pšenice, pokazali su da 1 kultivar (4,35%) ima *Vrn-A1a* alel, 6 kultivara (26,10%) ima *Vrn-A1b* (ili *Vrn-A1c*), dok je čak 16 kultivara (69,6%) imalo recesivni *vrn-A1* alel. Na *Vrn-B1* lokusu pronađen je recesivni *vrn-B1* u 20 kultivara (87%), dok je na *Vrn-B3* lokusu recesivni *vrn-B3* alel pronađen u 22 kultivara (95,7%). Dominantni *Vrn-D1* alel na *Vrn-D1* lokusu nije pronađen niti u jednom hrvatskom kultivaru (kod stranih pronađen je samo u kultivaru Chinese Spring), dok su sva 23 kultivara sadržavala recesivni *vrn-D1* alel. Rezultati i dokazuju da su to kultivari ozimih pšenica, dok se Nova Žitarka, jedini kultivar koji ima dominantni *Vrn-A1a* može smatrati fakultativnim kultivarom sa slabijom osjetljivosti na vernalizaciju. Kultivari Žitarka, Sana, Adriana, Marija, Prima i Cerera sadržavale su također i dominantni alel sa *Vrn-A1* lokusa, *Vrn-A1b* alel (ili s malom mogućnosti *Vrn-A1c* alel).

Kod 17 stranih kultivara koji su bili korišteni u istraživanju, omjeri su bili nešto drugačiji. Lokus *Vrn-A1* sadržavao je dominantni *Vrn-A1a* alel u dva kultivara (11,76%), niti jedan dominantni *Vrn-A1b* (ili *Vrn-A1c*), dok su svi kultivari sadržavali recesivni *vrn-A1*. Recesivni alel *vrn-B1* na lokusu *Vrn-B1* pronađen je u 16 kultivara (94,08%), a recesivni *vrn-B3* sadržavali su svih 17 kultivara. Na lokusu *Vrn-D1* pronađen je jedan dominantni

Vrn-D1 alel (5,88%), koji je ujedno i jedini pronađeni *Vrn-D1* alel u cijelom istraživanju. Recesivni *vrn-D1* alel istog lokusa pronađen je u 14 stranih kultivara (82,32%). Taj jedini *Vrn-D1* alel pronađen je u kultivaru Chinese Spring, koji uz posjedovanje i dominantnog *Vrn-A1a* alela označava jari kultivar. Drugi *Vrn-A1a* alel pronađen je u kultivaru Golin.

Identificirano je pet različitih kombinacija sa istraživanim alelima na hrvatskim kultivarima. Dominantni *Vrn-A1a*, uz recesivne *vrn-B1*, *vrn-B3* te *vrn-D1* pojavljuje se samo jednom (4,35%), i to u kultivaru Nova Žitarka, koji je ujedno i jedini *Vrn-A1a* pronađen od 23 hrvatska kultivara, i jedan od tri pronađena u svih 40 kultivara. Također je i jedini alel pronađen u kultivaru Nova Žitarka na tom lokusu, dok kultivari Chinese Spring i Golin uz *Vrn-A1a* sadrže i recesivni *vrn-A1*. Ti dominantni aleli ukazuju na jare ili fakultativne kultivare. Druga kombinacija je kombinacija recesivnih alela, *vrn-A1*, *vrn-B1* i *vrn-D1*, pojavljuje se isto u samo jednom kultivaru, Osječka 20 (4,35%). Treća kombinacija je s recesivnim alelima *vrn-A1*, *vrn-B3* i *vrn-D* i javlja se u 3 kultivara: Slavonija, Zlatna Dolina i Barbara (13,05%). Druga i treća kombinacija alela ukazuju na ozime kultivare. Predzadnja kombinacija sadrži dominantni *Vrn-A1b* (ili *Vrn-A1c*) na *Vrn-A1* lokusu, te sva tri recesivna alela sa *Vrn-B1*, *Vrn-B3* i *Vrn-D3* lokusa. Ta kombinacija alela pronađena je u 6 hrvatskih kultivara i to: Žitarka, Sana, Adriana, Marija, Prima i Cerera i ukazuje na fakultativne kultivare. Zanimljivo je da dvije sestrinske linije, Cerera i Koleda, nemaju iste alele, Koleda posjeduje recesivni *vrn-A1a* alel, dok Cerera posjeduje dominantni *Vrn-A1b* (ili *Vrn-A1c*) alel na *Vrn-A1* lokusu. Samo ispitivanje rodoslovlja nije dovoljan pokazatelj jesu li kultivari ozimi ili jari, te je potrebno provesti istraživanje na molekularnoj razini usporedno sa podacima o rodoslovlju. Zadnja kombinacija ukazuje na ozimi tip za 12 proučavanih kultivara pšenica (52,20%), i to kombinacijom recesivnih alela *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-B3* i *vrn-D1*. Ti su ozimi kultivari: U1, Srpanjka, Demetra, Superžitarka, Golubica, Janica, BC Elvira, Kuna, Koleda, Divana, Gabi i Dea.

U 17 stranih kultivara pronađene su četiri kombinacije alela, a najčešća je kombinacija recesivnih alela *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-B3* te *vrn-D1*. Takav raspored pojavljuje se u 13 istraživanih kultivara (76,44%) i to u ozimim kultivarima Kavkaz, Mv 14, Pesma, NS 602, Renesansa, Sofija NS, NS Rana 1, San Pastore, Libellula, Miranovskaya 808, Bankuty 1205, SW Maxi te MV 18. U dva kultivara, Florida i Sava, kombinacija je isto recesivnih alela, i to *vrn-A1*, *vrn-B1* i *vrn-B3*. Recesivni *vrn-D1* alel nije pronađen u ta dva kultivara

(kao ni u kultivaru Chinese Spring), dok je pronađen u svim istraživanim hrvatskim kultivarima pšenice. Kultivar Chinese Spring, osim što nema *vrn-D1* alel, razlikuje se i po tome što na *Vrn-A1* lokusu sadrži dominantni *Vrn-A1a* i recesivni *vrn-A* alel. Kultivar Golin sadrži iste alele kao i Chinese Spring na *Vrn-A1* lokusu, ali u njemu nije pronađen recesivni *vrn-B1* alel. Golin i Chinese Spring ukazuju na jare kultivare.

Zhang i sur. (2008.) istraživali su *Vrn* gene u 278 kineskih kultivara heksaploidne pšenice. Potvrdili su prisutnost dominantnog alela *Vrn-A1a* u 68 ispitivana kultivara, *Vrn-A1b* u tek 8 ispitivanih kultivara, dok dominantni *Vrn-A1c* alel nije bio pronađen niti u jednom ispitivanom kultivaru. Recesivni *vrn-A1* alel bio je pronađen u 202 kultivara. Dominantni *Vrn-B1* alel bilo je prisutan u 73 ispitivana kultivara, dok je u nešto više njih, čak 105, pronađen *Vrn-D1* alel. Niti ovo istraživanje na 23 hrvatska kultivara nije potvrdilo prisutnost *Vrn-A1c* alela, dok je frekvenicija *Vrn-A1a* alela bila niska, a recesivnog *vrn-A1* visoka.

Iwaki i sur. (2001) proučili su 272 kultivara pšenice iz različitih geografskih regija i to je istraživanje pokazalo da su razlike u *Vrn* genotipovima povezane s njihovim podrijetlom. U europskim kultivarima heksaploidne pšenice najčešći alel je *Vrn-A1* alel, dominantni *Vrn-B1* alel ima umjerenu učestalost, dok se dominantni alel *Vrn-D1* pojavljuje vrlo rijetko. Frekvencije *Vrn* alela razlikovale su se od onih koje su zabilježene kod kultivara iz Azije i Južne Amerike. U hrvatskim kultivarima frekvencije proučavanih alela također su odstupale od navedenog istraživanja.

U najnovijim istraživanjima Scherban i sur. (2015.) koristili su *Msp*I restrikcijsku endonukleazu kako bi razlikovali produkte za *Vrn-A1b* i *vrn-A1* alele jer rezolucija samog agaroznog gela nije dovoljna za precizno razlikovanje spomenutih produkata (714 pb i 734 pb). Taj enzim daje produkte od 138 pb za recesivni *vrn-A1* alel i 118 pb za *Vrn-A1b*. Produkti od 138 pb označavali su recesivni *vrn-A1* alel ili dominantni *Vrn-A1c* sa delecijom u intronu. Da bi ih razlikovali koristili su početnice kao i u ovom istraživanju, Intr1/C/F i Intr1/AB/R, i dobili sve produkte od 1068 pb te zaključili da su svi kultivari nosili recesivni *vrn-A1* alel. Od 245 ispitivana kultivara, u 153 pronađen je dominantni *Vrn-A1a* alel, *Vrn-A1b* u 13 njih, te recesivni *vrn-A1* u 79 kultivara. Proširenjem istraživanja sa *Msp*I restrikcijskom endonukleazom mogli bi se preciznije razlikovati *Vrn-*

*A1b (*714 pb) od *Vrn-A1c* (734 pb) alela dobiveni VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnicama, dok se *vrn-A1* (734 pb) od *Vrn-A1c* (734 pb) kasnije mogu razlikovati Intr1/C/F i Intr1/AB/R početnicama kako i je dobiveno u 16 hrvatskih kultivara sa recesivnim *vrn-A1* alelom.

Nemogućnost pronalaska određenih alela u ovom istraživanju može biti rezultat stranooplodnje, stoga bi bilo preporučeno u daljnjim istraživanjima uzeti uzorke iz gen banke. Razlog u neslaganju očekivane i dobivene distribucije gena može biti i posljedica mutacija koje se može javiti u svakoj generaciji u frekvenciji od 10^{-6} (Borojević, 1981.), no može doći i do nespecifičnog vezanja početnica markera za drugi niz parova baza koje ne predstavljaju ciljani gen što se može dogoditi ukoliko je temperatura nalijeganja početnica viša ili niža od preporučene temperature. U tom slučaju nespecifičnosti primjenjenih markera prilikom PCR reakcije mogu se amplificirati fragmenti DNA iste veličine kao i traženi fragmenti. Neuspjela amplifikacija također može dovesti do brojnih nespecifičnih DNA produkata različitih veličina ili bez produkata. Drugi potencijalni problem nastaje kada su mutacije nenajmjerno uvedene u samim početnicama, što može rezultirati nastajanje heterogene populacije PCR proizvoda. Kako bi se to izbjeglo važno je pratiti i razumjeti osnovne principe PCR protokola, tom metodologijom osigurava se dobivanje ciljanih sekvenci te predstavlja strategije za optimizaciju reakcija (Lorenz, 2012.).

6. Zaključak

Na temelju laboratorijskih istraživanja, provedenih u laboratoriju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, tijekom 2013., 2014. i 2015. godine, sa ciljem ispitivanja varijabilnosti alela na *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* i *Vrn-D1* gen lokusima pomoću molekularnih markera u 23 hrvatska i 17 stranih kultivara pšenice, može se zaključiti sljedeće:

1. Na *Vrn-A1* lokusu identificirana su četiri različita alela od kojih je najzastupljeniji bio recesivni *vrn-A1* sa 1060 pb početnicama Intr1/C/F i Intr1/AB/R ili korištenjem VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnica gdje se nije razlikovao od dominantnog *Vrn-A1c* sa 734 pb. Pronađen je u16 hrvatskih i svih 17 stranih kultivara, s učestalosti od 82,5%.

2. Na *Vrn-B1* lokusu, Intr1B_L i Intr1B_R4 početnicama identificiran je recesivni *vrn-B1* alel (1149 pb) pronađen u 20 hrvatskih i 16 stranih kultivara.

3. Korištenjem VRN3_BNOINS_L i VRN3_BNOINS_R početnica identificiran je recesivni *vrn-B3* alel (1140 pb) u čak 22 hrvatska i svih 17 stranih kultivara.

4. Korištenjem Intr1D_L i Intr1D_R3 početnica utvrđen je dominantni *Vrn-D1* (1671 pb) u stranom kultivaru Chinese Spring. Dok je recesivni *vrn-D1* alel s početnicama Intr1D_L i Intr1D_R4 pronađen u 37 ispitivana kultivara (23 hrvatska i 14 stranih kultivara). Produkti amplifikacije iznosili su 997 pb.

5. Najčešća kombinacija bila je utvrđena sa sva četiri recesivna alela, *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-B3* i *vrn-D1*. Identificirana je u 62,5% ispitivanih kultivara i to u 12 hrvatskih i 13 stranih.

6. Prisutnost recesivnih gena koji se aktiviraju u vremenu vernalizacije potvrđuje ozimi tip ispitivanih kultivara.

7. Popis literature

Ahrens, J.F. (1957). Vernalisation and photoperiodism of winter wheat. Iowa state College. Dissertation Submitted to the Graduate Faculty in Partial Fulfillment of The Requirements for the Degree as Doctor of Philosophy. Iowa, 1957. Plant Physiology.

Ahrens, J.F. Loomis, W.E (1963). Floral induction and development inwinter wheat. Crop Science, 3(6):463-466.

Amasino, R. (2004). Vernalization, Competence, and the Epigenetic Memory of Winter. The Plant Cell, 16(10):2553-2559.

Borojević, S. (1981.): Principii metodi oplemenjivanja bilja, Izdavački centar Radničkog univerziteta Radivoj Ćirpanov, Novi Sad

Braun H.-J., Altay F., Kronstad W.E., Beniwal S.P.S., i McNab A. (1997.) Wheat: Prospects for global improvement, Developments in plant breeding, Springer Science + Business Media, Dordrecht

Brooking I.R. (1996). Temperature Response of Vernalization in Wheat : A Developmental Analysis. Annals of Botany 78: 507-512.

Brooking, I.R., Jamieson, P.D., Porter, J.R. (1995). The influence of daylength on final leaf number in spring wheat. Field Crops Research, 41(3), 155-165.

Chouard, P. (1960). Vernalization and its relations to dormancy. Annual Review of Plant Physiology, 11:191-237.

Davidson, J.L., Christian K.R., Jones, D.B., Bremner , P.M. (1985). Responses of wheat to vernalization and photoperiod. Australian Journal of Agricultural Research, 36(3):347-359.

Delecolle, R., Hay, R.K.M., Guerif, M., Pluchard, P., Varlet-Grancher, C. (1989). A method of describing the progress of apical development in wheat, based on the time-course of organogenesis. Field Crops Research, 21(2):155-165.

Dhillon, T., Pearce, S.P., Stockinger, E.J., Distelfelda, L.C., Li, C., Knox, A.K., Vashegyi, I., Vagujfalvi, A., Galiba, G., Dubcovsky, J. (2010). Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: The VRN-1connection.Plant Physiology, 153:1846–1858.

Dipak Santra, K., Santra, M., Allen, R.E., Campbell, K.G., Kidwell, K.K. (2009). Genetic and Molecular Characterization of Vernalization Genes Vrn-A1, Vrn-B1, and Vrn-D1 in Spring Wheat Germplasm from the Pacific Northwest Region of the U.S.A. Plant Breeding, 1-10.

Distelfeld, A., Li, C., Dubcovsky, J. (2009). Regulation of flowering in temperate cereals. Current Opinion in PlantBiology, 12: 178–184.

Distelfeld, A., Tranquilli, G., Li, C., Yan, L., Dubcovsky, J. (2009). Genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat. Plant Physiology, 149(1):245-257.

Dong-Hwan, K., Sibum, S. (2014). Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization. Arabidopsis, 12(171): published online.

Fu, D., Szucs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J.S., Vonzitzewitz, J., Hayes, P.M., Dubcovsky, J. (2005).). Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. Molecular Genetics and Genomics, 273(1): 54-65.

Gassner, G. (1918). Beiträge zur physiologiischen Charakteristik sommer- und winterannueller Gewächse, insbesondere der Getreidepflanzen. Zeitschr. Bot., 10:417-480.

Garner. W.W., Allard, H.A. (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. Monthly Weather Review, 48(7):415-415.

Goncharov, N.P. (2004). Response to vernalization in wheat: Its quantitative or qualitative nature. Cereal Research Communications, 32(3):323-330.

Gororo, N.N., Flood, R.G., Eastwood, R.F., Eagles, H.A. (2001). Photoperiod and vernalization responses in Triticum turgidum x T. tauschii synthetic hexaploid wheats. Annals of Botany, 88(5): 947-952.

Gotoh, T. (1980). Gene analysis of the degree of vernalisationrequirement in winter wheat. Jpn J. Breeding, 30:1-10.

Gotoh, T. (1983). Varietal variation and inheritance mode ofvernalisation requirement in common wheat. Zbornik radova. Sixth international wheat genetic symposium. Kyoto Japan:475-478.

Hansel, H. (1953). Vernalization of winter rye by negative temperatures and the influence of vernalization upon the lamina length of the first and second leaf in winter rye, spring barley, and winter barley. Annals of Botany, 17(3):417-432.

Hay, R.K.M., Kemp, D.R. (1990). Primordium initiation at the stem apex as the primary event controlling plant development : preliminaryevidence from wheat for the regulation of leaf development : preliminary evidence from wheat for the regulation of leaf development. Plant Cell and Environment, 13(9):1005-1008.

Hay, R.K.M., Kirby, E.J.M. (1991). Convergence and synchrony–a review of the coordination of development in wheat. Australian Journal of Agricultural Research,42(5):661-700.

Heo, J.B., Yong-Suk, L., Sibum, S. (2013). Epigenetic regulation by long noncoding RNAs in plants. Chromosome Research, 21(0):685-693.

Heo, J.B., Sung, S. (2011). Vernalizaton-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. Science, 331:76-79.

Heo, J.B., Sung, S. (2011). Encoding memory od winter by noncoding RNAs. Epigenetics, 6:544-547.

Heo, J.B., Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. Science, 331(6013):76-9.

Herndl, M., White, J.W., Hunt, L.A., Graeff, S., Claupein, W. (2008). Field-based evaluation of vernalization requirement, photoperiod response and earliness per se in bread wheat (Triticum aestivum L.). Field Crops Research, 105(3):193-201

Hoogendoorn J. 1984. A comparison of different vernalization techniques in wheat Triticum aestivum. Journal of Plant Physiology, 116:11-20.

Iqbal, M., Navabi, A., Yang, R.C., Salmon, D.F., Spaner, D. (2007). Molecular characterization of vernalization response genes in Canadian spring wheat. Genome, 50: 511–516.

Iqbal, M., Shahzad, A., Iftikhar, A. (2011). Allelic variation at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3* and *Ppd-D1a* loci of Pakistani spring wheat cultivars. Electronic Journal of Biotechnology, 14(1):1-8.

Islam-Faridi, M.N., Worland, A.J., Law, C.N. (1996). Inhibition of ear-emergence time and sensitivity to day-length deter- mined by the group-6 chromosomes of wheat. Heredity, 77:572-580.

Iwaki, K., Haruna, S., Niwa, T., Kato, K. (2001). Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and Vrn genotype. Plant Breeding, 120(2):107-114

Iwaki, K., Nakagawa, K., Kuno, H., Kato, K. (2000). Ecogeographical differentiation in East Asian wheat, revealed from the geographical variation of growth habit and Vrn genotype. Euphytica, 111(2):137-143.

Kirby, E.J.M. (1974). Ear development in spring wheat. Journal of Agricultural Science, 82(3):437-447.

Kirby, E.J.M. (1990). Co-ordination of leaf emergence and leaf and spikelet primordium initiation in wheat. Field Crops Research, 25(3-4):253-264.

Kiss, T., Balla K., Veisz, O., Láng, L., Bedő, Z., Griffiths, S., Isac, P., Karsai, I. (2014). Allele frequencies in the *VRN-A1*, *VRN-B1* and *VRN-D1* vernalization response and *PPD-B1* and *PPD-D1* photoperiod sensitivity genes, and their effects on heading in a diverse set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Molecular Breeding, 34(2):297-310.

Korzun, V., Roder, M., Worland, A.J., Borner, A. (1997). Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (Rht12) and vernalization (Vrn1) in wheat by using RFLPand microsatellite markers. Plant Breeding,116:227–232

Košner, J., Pánkoá, K. (1998). The detection of allelic variants at the recessive vrnloci of winter wheat. Euphytica, 101: 9–16.

Košner, J., Pánkoá, K.(1999).): Impact of homoeologous group 5 chromosomes with different vrn loci on leaf size and tillering. Plant Breed., 35: 65–72

Košner, J., Pánkoá, K.(2002). Vernalisation Response of Some Winter Wheat Cultivars. (Triticum aestivum L.) Plant Breed, 38(3-4):97-103.

Purvis O.N. (1984). Studies in vernalization XI. The effect of date of sowing and of excising the embryo upon the responses of Petkus winter rye to different periods of vernalization treatment. Annals of Botany, 12(2):183-206.

Lenova, I., Pestsova, E., Salina, E., Efremova, T., Roder, M., Borner, A. (2003). Mapping of the Vrn-B1 gene in Triticum aestivum using microsatellite markers. Plant Breeding, 122: 209–212

Li, G., Yu, M., Fang, T., Cao, S., Carver, B.F., Yan, L. (2013). Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by TaVRN-A1 at the protein level. Plan Journal, 76(5), 742-753.

Markowski, A., Rapacz, M. (2008). Comparison of Vernalization Requirements and Frost Resistance of Winter Rape Lines Derived from Double Haploids. Journal of Agronomy and Crop Science, 173(3-4):184-192.

Martinčić, J., Kozumplik V.(1996). Oplemenjivanje bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.

Mcintosh, R.A., Yamazaki,Y., Devos, K.M., Dubcovsky, J., Rogers, W.J., Appels, R. (2003). Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Zbornik radova. Tenth international wheat genetics symposium. Paestum Italy, 1-47.

Miura, H., Worland, A.J. (1994). Genetic control of vernalization day-length response, and earliness per se by homoelogous group-3 chromosomes in wheat. Plant Breeding, 113: 160–169

Nowak, M., Kowalczyk, K. (2010). Allelic Variation at the VRN-1 locus of polish cultivars of common wheat (Triticum Aestivum L). Series Botanica, 52(2):86-91.

Reinink, K., Jorritsma, I., Darwinkel, A. (1986). Adaptation of the AFRC wheat phenology model for Dutch conditions. Netherlands Journal of Agricultural Science, 34:1-13

Ritchie, J.T. (1991). Wheat phasic development. U: Ritchie, J.T. and Hanks, R.J. (ur). Modeling plant and soil systems. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, 31-54.

Sarma, R.N., Gill, B.S., Sasaki, T., Galiba, G., Sutka, J., Laurie, D.A., Snape, J.W. (1998). Comparative mapping of the wheat chromosome 5A Vrn-A1 region with rice and its relationship to QTL for flowering time. Theoretical and Applied Genetics, 97: 103–109.

Scherban, A. B., Börner, A., Salina, E. A. (2015.) Effect on *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars. Plant Breeding, 134, 49-55

Shindo, C., Sasakuma, T. (2002). Genes responding to vernalization in hexaploid wheat. TAGTheoretical Applied Genetics, 104(6-7):1003-1010.

Snape, J.W., Sarma, R., Quarrie, S.A., Fish, L., Galiba, G., Sutka, J. (2001). Mapping genes for flowering time and frost tolerance in cereals using precise genetic stocks. Euphytica, 120: 309–315

Stelmakh, A.F. (1992). Genetic effect of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat. *Euphytica*, 65(1):53-60.

Stelmakh, A.F. (1987). Growth habit in common wheat (Triticum aestivum L. EM. Thell. Euphytica, 36:513-519.

Stelmakh, A.F. (1998). Genetic systems regulating flowering response in wheat. Euphytica, 100(1-3): 359-369.

Sun, Q.M., Zhou, R.H., Gao, L.F., Zhao, G.Y., Jia, J.Z. (2009). The characterization and geographical distribution of the genes responsible for vernalization requirement in Chinese bread wheat. Journal of Integrative PlantBiology,51(4): 423–432.

Sung, S., Amasino, R.M. (2004). Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. Nature, 427:159-164.

Sutka, J., Galiba, G., Vagujfalvi, A., Gill, B.S., Snape, J.W. (1999). Physical mapping of the Vrn-A1and Fr1 genes on chromosome 5A of wheat using deletion lines. Theoretical and Applied Genetics,
99: 199–202

Tranquilli, G., Dubcovsky, J**.** (2000). Epistatic interaction between vernalization genes Vrn-Am1 and Vrn-Am2 in Triticum monococcum. J. Hered, 91(4)**:**304–306.

Trione, E.J., Metzer, R.J. (1970). Wheat and barley vernalization in a precise temperature gradient.Crop Science, 10(4):390-392.

Weir, A.H., Bragg, P.L., Porter, J.R., Rayner, J.H. (1984). A winter wheat crop simulation model without water or nutrient limitations. Journal of Agricultural Science, 102(2):371-382.

Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Dubcovsky, J. (2006). The wheat and barley vernalization gene VRN3is an orthologue of FT. Proceeding of the National Academy of Sciences, 103:19581-19586.

Yan, L., Helgura, M., Kato, K. Fukuyama, S., Sherman, J., Dubcovsky, J. (2004). Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. Theoretical Applied Genetics, 109(8): 1677-1686.

Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., Sanmiguel, P., Bennetzen, J.L., Echenique, V., Dubcovsky, J. (2004). The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. Science, 303:1640–1644.

Yan, L., Loukoianov, A., Tranquili, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J. (2003). Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. National Academy of Sciences, 100:6263-6268.

Zhang, X.K., Xiao, Y.G., Zhang, Y., Xia, X.C., Dubcovsky, J., He, Z.H. (2008). Allelic variation at the vernalization genes Vrn-A1,Vrn-B1,Vrn-D1, and Vrn-B3in Chinese wheat cultivarsand their association with growth habit. Crop Science, 48:458–470.

Internet izvori:

http://faostat.fao.org

http://www.farming.co.uk/news/article/8071

http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Vrn/

Fanning B. Vernalization of Winter Wheat. 15. listopad 2012. http://igrow.org/agronomy/wheat/vernalization-of-winter-wheat/. 31. kolovoz 2012.

Griffith, P. What late sown wheat need to vernalise and flower. 07. ozujak 2013. http://www.farming.co.uk/news/article/8071. 31. kolovoz 2015.

Jurišić M. Pšenica (Triticum AP.L). Svibanj 2014. http://www.obz.hr/vanjski/CD_AGBASE2/PDF/Psenica.pdf. 31. kolovoz 2015.

Lorenz, T. C., Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies, 2012. http://www.jove.com/video/3998/polymerase-chain-reaction-basic-protocol-plus-troubleshooting

Pujari, S. Effects of Photoperidism for the Development of Plants: by Garner and Allard (1920). http://www.yourarticlelibrary.com/biology/plants/effects-of-photoperiodism-for-the-development-of-plants-by-garner-and-allard-1920/23201/. 31. kolovoz 2015.

8. Sažetak

Niske temperature u određenim fazama razvoja žitarica su potrebne kako bi došlo do klasanja i formiranja zrna, što izravno utječe i na prinos. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati genetsku varijabilnost *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* te *Vrn-D1* gen lokusa u 23 hrvatska ozima i 17 stranih kultivara korištenjem molekularnih markera. Gen *Vrn-A1* se sastoji od četiri različite alelne varijante. *Vrn-A1a* alel pronađen je u jednom hrvatsko kultivaru (4,35%), te u dva strana (11,76%). U šest hrvatskih (26,10%) kultivara utvrđen je *Vrn-A1b* (ili *Vrn-A1c*) alel, dok kod stranih nije pronađen ni u jednom kultivaru. Recesivni *vrn-A1 alel* pronađen je u 16 kultivara (69,6%) hrvatskog podrijetla te u svim stranim kultivarima. Na *Vrn-B1* lokusu pronađen je recesivni *vrn-B1* alel u 20 hrvatskih (87%) i 16 (94,08%) stranih kultivara, dok je recesivni *vrn-B3* alel pronađen u čak 22 hrvatska kultivara (95,7%), te u svih 17 stranih. Dominantni *Vrn-D1* alel nije pronađen u hrvatskim kultivarima, a u stranim pronađen je samo u kultivaru Chinese Spring (5,88%). U svim hrvatskim kultivarima identificiran je recesivni *vrn-D1* alel te u 14 stranih kultivara (82,32%).

9. Summary

Low temperatures during different developmental stages of cereals are needed in order for them to emergence and form kernel, thus they have a direct influence on a yield. The aim of this study was to examine genetic variability of *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* and *Vrn-D1* loci at 23 Croatian winter and 17 foreign wheat varieties using molecular markers. The *Vrn-A1* gene, was identified with four different combinations of alleles. The *Vrn-A1a* allele was found in one Croatian wheat variety (4.35%) and in two foreign wheat varieties (11.76%). In six Croatian wheat varieties (26.10%) *Vrn-A1b* (or *Vrn-A1c*) allele was identified, while in terms of foreign wheat varieties there were no latter alleles. A recessive *vrn-A1* allele was found in 16 wheat varieties of Croatian origin (69.6%) and in all foreign varieties. A recessive *vrn-B1* was found on the *Vrn-B1* locus in 20 Croatian (87%) and 16 foreign (94.08%) varieties, while a recessive *vrn-B3* on the latter was found in 22 Croatian wheat varieties (95.7%), and in all foreign varieties. The dominant *Vrn-D1* allele was not found in any of Croatian wheat varieties, while in terms of foreign varieties it was found only in Chinese Spring variety (5.88%). A recessive *vrn-D1* allele was identified in all Croatian wheat varieties, while it was found only in 14 foreign varieties (82.32%).

10. Popis tablica

Br.	Naziv tablice	Str.
Tablica 1.	Naziv, podrijetlo, godina i rodoslovlje hrvatskih kultivara	12.
Tablica 2.	Naziv, podrijetlo, godina i rodoslovlje stranih kultivara	13.
Tablica 3.	Koncentracija DNA i PCR razrjeđenja	19.
Tablica 4.	Sekvence i razrjeđenja korištenih početnica	20.
Tablica 5.	Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR amplifikaciju svih korištenih početnica (osim VRN1A_L i VRN1-INT1_R)	21.
Tablica 6.	PCR program za VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnice	21.
Tablica 7.	PCR program za Intr1/C/F i Intr1/AB/R početnice	22.
Tablica 8	PCR program za Intr1B_L i Intr1B_R3 početnice	22.
Tablica 9.	PCR program za Intr1B_L i Intr1B_R4 početnice	23.
Tablica 10.	PCR program za VRN3_BINS_L i VRN3_BINS_R početnice	23.
Tablica 11.	PCR program za VRN3_BNOINS_L i VRN3_BNOINS_R početnice	24.
Tablica 12.	PCR program za Intr1D_L i Intr1D_R3 početnica	24.
Tablica 13.	PCR program za Intr1D_L i Intr1D_R4 početnice	25.
Tablica 14.	Varijabilnost alela *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* i *Vrn-D* lokusa u 23 hrvatska kultivara	28.
Tablica 15.	Varijabilnost alela *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* i *Vrn-D* lokusa u 17 stranih kultivara	29.

11. Popis slika

Br.	Naziv slike	Str.
Slika 1.	Sjeme posijano u tresetne tablete u klima komori (foto original; J. Puškarić)	14.
Slika 2.	Uzorci na stalku za mućkanje (foto original; J. Puškarić)	15.
Slika 3.	Uzorci spremljeni za centrifugiranje (foto original; J. Puškarić)	16.
Slika 4.	Slika 4. Odvajanje tekuće od krute faze (foto original; J. Puškarić)	16.
Slika 5.	Vidljiva DNA (foto original; J. Puškarić)	17.
Slika 6.	Uređaj za elektroforezu i kadica s agaroznim gelom (foto original; J. Puškarić)	26.
Slika 7.	G:BOX uređaj za snimanje gela (foto original; J. Puškarić)	27.
Slika 8.	Produkti PCR amplifikacije VRN1A_L i VRN1-INT1_R početnica (foto original; J. Puškarić)	30.
Slika 9.	Produkti PCR amplifikacije Intr1/C/F, Intr1/AB/R početnica (foto original; J. Puškarić)	31.
Slika 10.	Produkti PCR amplifikacije Intr1B_L i Intr1B_R4 početnica (foto original; J. Puškarić)	32.
Slika 11.	Produkti amplifikacije VRN3_BNOINS_L i VRN3_BNOINS_R početnica (foto original; J. Puškarić)	33.
Slika 12.	Produkti PCR amplifikacije Intr1D_L i Intr1D_R4 početnica (foto original; J. Puškarić)	34.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Identifikacija *Vrn* gena u hrvatskom sortimentu ozime pšenice

Josipa Puškarić

Sažetak: Niske temperature u određenim fazama razvoja žitarica su potrebne kako bi došlo do klasanja i formiranja zrna, što izravno utječe i na prinos. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati genetsku varijabilnost *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* te *Vrn-D1* genlokusa u 23 hrvatska ozima i 17 stranih kultivara korištenjem molekularnih markera. Gen *Vrn-A1* se sastoji od četiri različite alelne varijante. *Vrn-A1a* alel pronađen je u jednom hrvatskom kultivaru (4,35%), te u dva strana (11,76%). U šest hrvatskih (26,10%) kultivara utvrđen je *Vrn-A1b* (ili *Vrn-A1c*) alel, dok kod stranih nije pronađen ni u jednom kultivaru. Recesivni *vrn-A1 alel* pronađen je u 16 kultivara (69,6%) hrvatskog podrijetla te u svim stranim kultivarima. Na *Vrn-B1* lokusu pronađen je recesivni *vrn-B1* alel u 20 hrvatskih (87%) i 16 (94,08%) stranih kultivara, dok je recesivni *vrn-B3* alel pronađen u čak 22 hrvatska kultivara (95,7%), te u svih 17 stranih. Dominantni *Vrn-D1* alel nije pronađen u hrvatskim kultivarima, a u stranim pronađen je samo u kultivaru Chinese Spring (5,88%). U svim hrvatskim kultivarima identificiran je recesivni *vrn-D1* alel te u 14 stranih kultivara (82,32%).

Rad je izveden pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: doc. dr. sc. Sonja Petrović

Broj stranica: 52

Broj grafikona i slika: 12

Broj tablica: 15

Broj literaturnih navoda: 79

Broj briloga:

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: pšenica, vernalizacija, Vrn geni, molekularni markeri

Datum obrane:

Stručno povjeranstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Sonja Marić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Sonja Petrović, mentor
3. doc. dr.sc. Andrijana Rebekić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Identification of Vrn genes in Croatian wheat varieties

Josipa Puškarić

Abstract: Low temperatures during different developmental stages of cereals are needed in order for them to emergence and form kernel, thus they have a direct influence on a yield. The aim of this study was to examine genetic variability of *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-B3* and *Vrn-D1* loci at 23 Croatian winter and 17 foreign wheat varieties using molecular markers. The *Vrn-A1* gene, was identified with four different combinations of alleles. The *Vrn-A1a* allele was found in one Croatian wheat variety (4.35%) and in two foreign wheat varieties (11.76%). In six Croatian wheat varieties (26.10%) *Vrn-A1b* (or *Vrn-A1c*) allele was identified, while in terms of foreign wheat varieties there were no latter alleles. A recessive *vrn-A1* allele was found in 16 wheat varieties of Croatian origin (69.6%) and in all foreign varieties. A recessive *vrn-B1* was found on the *Vrn-B1* locus in 20 Croatian (87%) and 16 foreign (94.08%) varieties, while a recessive *vrn-B3* on the latter was found in 22 Croatian wheat varieties (95.7%), and in all foreign varieties. The dominant *Vrn-D1* allele was not found in any of Croatian wheat varieties, while in terms of foreign varieties it was found only in Chinese Spring variety (5.88%). A recessive *vrn-D1* allele was identified in all Croatian wheat varieties, while it was found only in 14 foreign varieties (82.32%).

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: doc. dr. sc. Sonja Petrović

Number of pages: 52

Number of figures: 12

Number of tables: 15

Number of references: 79

Number of appendices:

Original in: Croatian

Key words: wheat, vernalization, *Vrn* genes, molecular marker

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. prof. dr. sc. Sonja Marić, chairman
2. prof. dr. sc. Sonja Petrović, mentor
3. doc. dr.sc. Andrijana Rebekić, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.