Varijabilnost Rht gena hrvatskih sorata ozime pšenice

Ravlić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:151:283435

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

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

Ivana Ravlić, apsolvent

Diplomski studij Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

VARIJABILNOST *Rht* GENA HRVATSKIH SORATA OZIME PŠENICE

Diplomski rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Ravlić, apsolvent

Diplomski studij Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

VARIJABILNOST *Rht* GENA HRVATSKIH SORATA OZIME PŠENICE

Diplomski rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Ravlić, apsolvent

Diplomski studij Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

VARIJABILNOST *Rht* GENA HRVATSKIH SORATA OZIME PŠENICE

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Vlado Guberac, predsjednik
2. prof. dr. sc. Sonja Marić, mentor
3. doc. dr. sc. Sonja Petrović, član

Osijek, 2014.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj istraživanja 2

2. Pregled literature 3

2.1. „Zelena revolucija“ i *Rht* geni u oplemenjivanju pšenice 3

2.2. Istraživanja varijabilnosti *Rht* gena pomoću molekularnih markera 6

3. Materijal i metode 13

3.1. Biljni materijal 13

3.2. Metode rada 14

3.2.1. Poljski pokus, klimatski uvjeti i agronomska svojstva 14

3.2.2. Laboratorijski pokus 16

3.2.2.1. Uzgoj klijanaca i izolacija genomske DNA 16

3.2.2.2. Metoda mikrosatelitnih markera 21

3.2.2.3. Elektroforeza 24

3.2.3. Očitavanje rezultata i obrada podataka 26

4. Rezultati 27

4.1. Varijabilnost visine sorata pšenice u poljskom pokusu 27

4.2. Ispitivanje varijabilnosti na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu 28

4.3. Ispitivanje varijabilnosti na *Xgwm261* lokusu 31

5. Rasprava 33

5.1. Varijabilnost na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu i visina pšenice 33

5.2. Varijabilnost na na *Xgwm261* lokusu i visina pšenice 36

6. Zaključak 39

7. Popis literature 40

8. Sažetak 46

9. Summary 47

11. Popis tablica 48

12. Popis slika 49

13. Popis grafikona 50

1. Uvod

Pšenica (*Triticum aestivum* L. *spp. vulgare*) je, uz rižu i kukuruz, jedan od najznačajniji 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 polimorfizma, tj. velikog broja varijeteta i kultivara, odlikuje se širokim arealom rasprostranjenosti te se uzgaja u cijelom svijetu. Prema podatcima iz 2012. godine pšenica se uzgajala na 215 489 485 ha godišnje, te je zauzimala veću obradivu površinu od riže i kukuruza. Svjetska proizvodnja pšenice iznosila je 670 875 110 t s prosječnim prinosom od 3113,3 kg/ha. U Republici Hrvatskoj požete površine pšenice u 2012. godini iznosile su 186 949 ha, s prosječnim prinosom od 5347,3 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. Moderna tehnologija uzgoja pšenice podrazumijeva korištenje visokorodnih heksaploidnih pšenica sa stabilnim prinosom, a jedan od čimbenika koji kontrolira ove karakteristike jest visina biljke. Visina biljke kvantitativno je svojstvo kontrolirano s više major, ali i minor gena te je pod utjecajem okolišnih uvjeta (Chebotar i sur., 2001.). Još od početka 20. stoljeća glavna strategija smanjivanja visine stabljike pšenice bila je introdukcija *Rht* gena, odnosno gena za patuljasti (*dwarf*) i polupatuljasti (*semi-dwarf*) rast, u moderne sorte. Hedden (2003.) opisuje nagli porast ukupnog prinosa pšenice u svijetu početkom „Zelene revolucije“ kroz povećanu gnojidbu, što je činilo biljke višima i ujedno manje otpornima na polijeganje. Introdukcijom gena za patuljasti i polupatuljasti rast stvorene su sorte s nižom i čvršćom stabljikom povećanog žetvenog indeksa, manje podložne polijaganju te s boljom opskrbom asimilata za razvoj zrna.

Danas se u oplemenjivanju pšenice najčešće koriste *Rht-B1b* (*Rht1*) i *Rht-D1b* (*Rht2*) geni iz japanske sorte Norin 10 koji znatno utječu na smanjivanje visine stabljike i povećanje prinosa (Gale i Youssefian, 1985.), no u određenim agroklimatskim uvjetima mogu imati negativan utjecaj na morfološka i agronomska svojstva (Bai i sur., 2004.; Addisu i sur., 2009.; Clayshulte i sur., 2007.; Li i sur., 2011.). Alternativni gen u takvim uvjetima je *Rht8* gen iz japanske pšenice Akakomugi. Introdukciju i prenošenje ovih gena u zapadne sorte

pšenice opisali su Borojević i Borojević (2005.b). Za razliku od *dwarf* gena iz pšenice Norin 10 koji su osjetljivi na primjenu giberelinske kiseline (GA), *dwarf* geni iz pšenice Akakomugi, zajedno s *Rht8* genom, nisu osjetljivi na primjenu GA te njihova identifikacija u segregacijskim populacijama nije jednostavna. Time su otežana i genetska istraživanja ovih gena te njihov utjecaj na visinu biljke i agronomska svojstva.

Kako bi se identificirali geni odgovorni za određeni patuljasti ili polupatuljasti genotip potrebno ih je identificirati i mapirati na genetskoj mapi pšenice. Mikrosatelitni markeri pokazali su najveću učinkovitost za ispitivanje genetske različitosti (Plaschke i sur., 1995.; Dvojković, 2009.; Petrović, 2011.), te u identifikaciji i mapiranju agronomski važnih gena (Korzun i sur., 1997.; Korzun i sur., 1998.) zbog visokog stupnja polimorfizma i pravilne raspoređenosti po genomu pšenice. U tu svrhu izrađena je i mikrosatelitna mapa pšenice (Röder i sur., 1998.) koja omogućuje markerima potpomognutu selekciju u oplemenjivanju pšenice identifikacijom i unošenjem *Rht* gena u moderne sorte pšenice.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati genetsku varijabilnost *Rht* lokusa 20 hrvatskih i 10 stranih sorata ozime pšenice pomoću mikrosatelitnih markera te ih usporediti s izmjerenom visinom pšenice u poljskom pokusu.

2. Pregled literature

2.1. „Zelena revolucija“ i *Rht* geni u oplemenjivanju pšenice

Pojam „Zelena revolucija“ odnosi se na znatno povećanje prinosa pšenice tijekom 1960-ih godina, koje je ostvareno introdukcijom polupatuljastih sorata pšenice u oplemenjivačke programe razvijenih zemalja. Norman Borlaug je, introdukcijom *Rht-B1b (Rht1)* i *Rht-D1b (Rht2)* gena iz japanske sorte Norin 10 u oplemenjivački program CIMMYT-a, Meksiko, snizio visinu stabljike pšenice što je dovelo do višestrukog povećanja prinosa zrna. Smanjena visina stabljike značila je i manju mogućnost polijeganja te bolje usvajanje asimilata za razvoj zrna (Ellis i sur., 2007.a). Visoko produktivne pšenice niske stabljike, prilagođene razvoju u tropskim i subtropskim uvjetima, koje su nastale u ovim oplemenjivačkim programima proširene su u Južnu Ameriku, južnu i jugoistočnu Aziju (Hedden, 2003.).

Polupatuljaste sorte pšenice introducirane su u oplemenjivački materijal Europe i prije „Zelene revolucije“. 1920-ih godina, talijanski oplemenjivač Nazareno Strampelli pridonio je povećanju prinosa talijanske pšenice kroz povećanje otpornosti na hrđu, ranijom cvatnjom i sazrijevanjem te smanjivanjem visine stabljike (Salvi i sur., 2013.). Odabirom japanske pšenice Akakomugi, s niskom stabljikom i izrazito ranim sazrijevanjem (zbog posjedovanja *Rht8* i *Ppd-D1* gena), kao jednog od roditelja u križanju, Strampelli je dobio potomstvo biljaka nižih stabljika, otpornih na polijeganje koje su sazrijevale 1-3 tjedna ranije tako izbjegavajući sušni stres prije nalijevanja zrna (Borojević i Borojević, 2005.a). Linije proizašle iz križanja bile su, između ostalih, Mentana, Ardito, Villa Glori, a kasnije i San Pastore koje su korištene kao roditelji u oplemenjivačkim programima mnogih zemalja (Salvi i sur., 2013.).

Istraživanjima krajem 20.st. potvrđeno je da japanska pšenica Akakomugi posjeduje gen za snižavanje stabljike, *Rht8*, i gen neosjetljivosti na fotoperiod, *Ppd-D1*, koji se nalaze na 2D kromosomu. Ova dva gena su usko vezana (Korzun i sur., 1998.) i tako križanjem prenesena u mnoge talijanske sorte pšenice, koje su postale izvor gena za polupatuljaste sorte Južne i Srednje Europe. Razvojem ruske sorte Bezostaja 1 koja u svom pedigreu ima sortu Akakomugi, a kasnije i sorti Avrora i Kavkaz, *Rht8* i *Ppd-D1* geni proširili su se i u pšenice Istočne Europe (Borojević i Borojević, 2005.b). U talijanske pšenice, iz japanskog varijeteta Saitama 27, introduciran je još jedan gen za smanjivanje visine stabljike, *Rht-*

B1d, koji se zajedno s ostalim genima proširio u komercijalnim polupatuljastim sortama pšenice.

Do sada je identificirano 22 gena koji kontroliraju visinu stabljike pšenice i koji se nalaze na deset različitih kromosoma (Kang i sur., 2012.; McIntosh i sur., 2012.). Ovi geni označeni su kao *Rht* geni (Reduced Height) i prema McIntoshovom katalogu podijeljeni u dvije skupine s obzirom na reakciju na giberelinski kiselinu (GA) (tablica 1).

Tablica 1. Lista *Rht* gena, lokusa i alelnih varijanti

1. GA- neosjetljivi geni			**2. GA- osjetljivi geni**		
	Lokus	**Alelne varijante**		**Lokus**	**Alelne varijante**
Rht-1	D8; GAI*		***Rht4***	2BL**	
Rht-A1			***Rht5***	3BS**	
		Rht-A1a	***Rht6***		
Rht-B1	4B; 4BS**		***Rht7***	2A	
		Rht-B1a	***Rht8***	2D; 2DL**	
		Rht-B1b */ Rht1*			***Rht8a*** (165 bp)***
		Rht-B1c */ Rht3*			***Rht8b*** (174 bp)***
	4A	***Rht-B1d***			***Rht8c*** (192 bp)***
		Rht-B1e			***Rht8d*** (201 bp)***
		Rht-B1f			***Rht8e*** (210 bp)***
		Rht-B1g			***Rht8f*** (215 bp)***
		Rht-B1^{IC2196}			***Rht8g*** (196bp)***
Rht-D1	4D; 4DS**				***Rht8h*** (206 bp)***
		Rht-D1a	***Rht9***	7BS; 5AL**	
		Rht-D1b */ Rht2*	***Rht11***		
		Rht-D1c **/** *Rht10*	***Rht12***	5A	
		Rht-D1d	***Rht13***	7BS**	
			Rht14		
			Rht15		
			Rht16		
			Rht17		
			Rht18		
			Rht19		
			Rht20		
			Rht21		
			Rht22	7AS**	

* ortologni lokus (lokus D8- kukuruz;lokus GAI- *Arabidopsis*)

** S (short)/L (long)- kratki/dugi krak kromosoma

*** alelne varijante povezane sa SSR markerom *gwm261*

GA- neosjetljivi geni *Rht-B1b* i *Rht-D1b*, koji se nalaze na 4B i 4D kromosomu pšenice predstavljaju mutantni tip gena koji inhibiraju reakciju giberelina time smanjujući visinu stabljike (Hedden, 2003.).

Smanjivanje visine stabljike povezano je s povećanjem visine prinosa, a time i otpornosti na polijeganje (Ganeva i sur., 2005.; Šip i sur., 2010.; Lin i sur., 2014.; Rebetzke i sur., 2012.). Primjerice, Flintham i sur. (1997.) uspoređivali su prinos zrna niskih biljaka koje su imale *Rht-B1b, Rht-D1b* i *Rht-B1c* alele, s visokim biljkama u nekoliko pokusa. *Rht-B1b* i *Rht-D1b* alel imali su slični utjecaj na snižavanje stabljike (86% i 83% u usporedbi s kontrolom), dok je njihova kombinacija smanjivala visinu za 58%. *Rht-B1c* alel smanjivao je visinu stabljike za 50%. Uočen je i povećan prinos zrna niskih biljaka koji se kretao između 200 do 760 g m^{-2}. Također, Knopf i sur. (2008.) utvrdili su da sorte s *Rht-B1b* ili *Rht-D1b* alelom imaju nižu stabljiku i veći prinos od onih koje nisu imale ove *dwarf* gene.

Iako *Rht-B1b* i *Rht-D1b* imaju pozitivan učinak na smanjivanje visine stabljike i povećanje broja zrna i prinosa, uočen je i njihov negativan učinak na duljinu koleoptila, elongaciju listova, površinu lista klijanaca te izduživanje listova u dubokoj sjetvi (Bai i sur., 2004.; Addisu i sur., 2009.; Clayshulte i sur., 2007.; Li i sur., 2011.). Negativni utjecaj ovih gena uočava se posebice u južnoeuropskim mediteranskim zemljama sa sušnim ljetnim razdobljima i sušnim područjima Australije i Sjeverne Amerike (Ahmad i Sorrells, 2002.; Addisu i sur., 2009.), zbog osjetljivosti pšenice na visoku temperaturu prije klasanja (Liu i sur., 2005.). Ellis i sur. (2004) utvrdili su da je neosjetljivost na GA *Rht-B1b* ili *Rht-D1b* alela povezana sa smanjivanjem izduživanja listova i duljine koleoptila. Sličan učinak uočen je za gene *Rht11* i *Rht17*. S druge strane, nije uočen negativan učinak *Rht8* gena ni na jedno od ova dva svojstva.

U takvim uvjetima, smanjivanje visine stabljike postiže se uporabom GA- osjetljivog *Rht8* gena koji se nalazi na 2D kromosomu pšenice i usko je vezan za gen neosjetljivosti na fotoperiod *Ppd-D1* (Korzun i sur., 1998.). Kombinirani utjecaj ovih gena smanjuje visinu stabljike za 10 cm, povećava plodnost klasića i omogućuje ranije cvjetanje za osam dana (Gale i Youssefian, 1985.). *Ppd-D1* gen skraćuje životni ciklus biljke i time omogućuje izbjegavanje visokih temperatura tijekom cvjetanja.

2.2. Istraživanja varijabilnosti *Rht* gena pomoću molekularnih markera

Spomenuti *dwarf* geni identificirani su i klasificiranim putem testa na giberelinsku kiselinu, genetskim istraživanjima te istraživanjima pomoću molekularnih markera. Najčešće upotrebljavani molekularni makeri su mikrosateliti ili SSR markeri (eng. simple sequence repeats) bazirani na lančanoj reakciji polimerazom (PCR). SSR markeri predstavljaju dijelove DNA koji se sastoje od kratkih ponavljajućih sekvenci od 2 do 5 bp raspoređenih po genomu (Kumar i sur., 2009.).

Uporabom mikrosatelitnih markera omogućena je analiza varijabilnosti alela na *Xgwm261* lokusu koji je usko vezan za *Rht8* gen. Mikrosatelitnim markerom *gwm261* identificirane su tri najčešće alelne varijante rasprostranjene u polupatuljastim pšenicama, od 192 bp, 174 bp i 165 bp. Alel od 192 bp koji se nalazi u japanskoj sorti Akakomugi rasprostranjen je u pšenicama Južne Europe, dok su aleli od 174 bp i 165 bp, koji se nalaze u sortama Norin 10 i Saitama 27, najčešće nalaze u pšenicama Velike Britanije, Njemačke i Francuske, te u meksičkim pšenicama CIMMYT-a (Worland i sur., 1998., 2001.; Ahmad i Sorrells, 2002., Chebotar i sur., 2001.). Specifičnim mikrosatelitnim markerima omogućena je identifikacija i *Rht-B1b* i *Rht-D1b* gena u polupatuljastim sortama pšenica koje čine 95% današnjih komercijalnih pšenica. *Rht-B1b* i/ili *Rht-D1b* geni identificirani su u 70% polupatuljastih komercijalnih sorti (Liu i sur., 2005.; Hedden, 2003.).

U nastavku poglavlja dan je kratki pregled najznačajnijih istraživanja varijabilnosti *Rht* gena, pomoću mikrosatelitnih markera *gwm261,* za *Rht8* gen te specifičnih markera za identifikaciju *Rht-B1* i *Rht-D1* gena.

Ellis i sur. (2002.) razvili su „savršene“ PCR markere za identifikaciju *Rht-B1b* i *Rht-D1b* gena te ih ispitali na 19 sorata pšenice u kojima su prethodno identificirani *Rht* geni. Točna genotipizacija utvrđena je pomoću *Rht-B1b* i *Rht-D1b* specifičnih početnica kao i markera specifičnih za divlji tip alela, *Rht-B1a* i *Rht-D1a*. Ovi „savršeni “ markeri, tj. markeri specifični za promjenu parova baza odgovornu za polupatuljasti fenotip, mapirani su na kromosomima 4B i 4D.

PCR marker za *Rht-D1b* alel koji su razvili Ellis i sur. (2002.) korišten je u ispitivanju 421 sorte pšenice područja Kine (Yang i Liu, 2006.). Rezultati su pokazali da je *Rht-D1b* alel prisutan u 183 sorte (43,5%), no ima različitu distribuciju u različitim regijama uzgoja, vjerojatno zbog različitih izvora *dwarf* gena i agroekoloških uvjeta uzgoja. Od četiri zone

ozime pšenice, zona fakultativne ozimo-jare pšenice Žute i Huai rijeke imala je najveću učestalost *Rht-D1b* alela, 55.6%.

Pomoću testa reakcije na giberelinsku kiselinu (GA test) i SSR markera, Ganeva i sur. (2005.) identificirali su četiri alelne varijante na lokusu *Xgwm261* bugarskih sorata pšenice. Alele od 165 bp i 174 bp imale su sorte razvijene hibridizacijom sa stranim pšenicama dok su starije sorte razvijene iz primitivnih pšenica, imali rijetke alelne varijante od 211 bp i 215 bp. 42 od 76 modernih pšenica pokazala je reakciju na giberelinsku kiselinu. Alelna varijanta od 192 bp pronađena je u 64 (84,2%) moderne pšenice, od kojih 37 nose *Rht8* gen, a 27 imaju kombinaciju *Rht8* i GA- neosjetljive alele *Rht-B1d* (17); *Rht-D1b* (6) i *Rht-B1b* (4). Također, u sorata s *Rht-B1* alelima utvrđena je kraća stabljika nego kod sorata s *Rht-D1b* i *Rht8* genom, dok su najveći prinos i masu 1000 zrna imale sorte s kombinacijom *Rht-B1d* i *Rht8* alelne varijante od 192 bp.

Zhang i sur. (2006.) koristili su molekularne markere u identifikaciji *Rht-B1a, Rht-B1b, Rht-D1b* i *Rht8* gena te njihovu zastupljenost kod 220 sorata ozime pšenice područja Kine. Rezultati su pokazali dominaciju *Rht-D1b* i *Rht8* gena s učestalošću od 45,5% i 46,8%, dok je učestalost *Rht-B1b* alela iznosila 24,5%. Od 220 ispitivanih sorata, identificirane su 52 s *Rht-B1b* alelom (24,5%). U 40 sorata utvrđene su *Rht-D1b* i *Rht8*, 28 sorata *Rht-B1b* i *Rht8* i u jednoj sorti *Rht-B1b* i *Rht-D1b* kombinacije alela, a jedna je imala i sva tri gena.

Iako postoji uska povezanost alelne varijante od 192 bp na *Xgwm261* lokusu s *Rht8* lokusom (Korzun i sur., 1998.), prema Ellis i sur. (2007.b), prisutnost ovog alela na *Xgwm261* mikrosatelitnom lokusu ne mora uvijek biti povezana s *Rht8* genom i smanjivanjem visine stabljike. Analizom segregacijskih populacija nastalih križanjem s roditeljem koji nosi alel od 192 bp na *Xgwm261* lokusu, nisu utvrđene značajne razlike u visinama potomstva, što sugerira nedostatak *Rht8* gena. Rezultati istraživanja pokazali su i da sorta Norin 10 na *Xgwm261* lokusu ima alelnu varijantu od 192 bp, a ne 174 bp, koja ima jednaki nukleotidni identitet kao i alel od 192 bp japanske sorte Akakomugi.

Pomoću SSR markera, Clayshulte i sur. (2007.) ispitivali su varijabilnost alela na *Xgwm261* i *Rht-B1* lokusu u dvije populacije (Longhorn/Akron i Longhorn/Yuma) rekombinantnih inbred linija ozime pšenice te njihov utjecaj na osjetljivost na GA i duljinu koleoptila. U obje populacije prisutnost *Rht-B1b* alel smanjivala je visinu stabljike (u prosjeku 8,9%), osjetljivost na GA (u prosjeku 73,5%) i duljinu koleoptila (u prosjeku 11,3%) u odnosu na *Rht-B1a* alel. U Longhorn/Yuma populaciji, *Rht-B1b* i *Xgwm261*-165

bp genotipovi imali su nižu stabljiku od *Xgwm261*-210 bp i *Rht-B1a* genotipova te nije zabilježen negativan utjecaj *Xgwm261*-165 bp alela.

Knopf i sur. (2008.) ispitali su 95 njemačkih sorata pšenice priznatih 2004. godine, pomoću markera za *Rht-B1* i *Rht-D1* gen i SSR markera *gwm261* za gen *Rht8*. *Rht-D1b* alel identificiran je u 37,6% sorata, a samo 6% imalo je *Rht-B1b* alel, koji je prevladavao u sortama sjeverne Europe. Kod sorata s *Rht-B1b* ili *Rht-D1b* alelom utvrđena je niža stabljika i veći prinos od onih koje nisu imale *dwarf* gene. Na *Rht8* lokusu prevladavale su alelne varijante od 165 i 174 bp (90% sorata), dok je preostalih 10% sorata imalo alel od 197 bp. Alelna varijanta od 192 bp nije pronađena ni u jednoj sorti.

Kako bi evaluirali 172 sorte pšenice iz 20 zemalja, Tošović-Marić i sur. (2008.) koristili su SSR i STS markere za identifikaciju *Rht-B1b*, *Rht-D1b* i *Rht8* gena. Alel *Rht- B1b* pronađen je u 40% sorata, te je imao veću učestalost u stranim (57,6%) nego u domaćim pšenicama (22,6%). *Rht-D1b* alel bio je prisutan u 22% sorata, podjednako u stranim i domaćim. *Rht8* gen identificiran je u 62% sorata, s učestalošću od 78,3% u domaćim sortama.

U istraživanju koje su proveli Guedira i sur. (2010.) ispitivane su učestalosti *Rht-B1, Rht-D1* i *Rht8* gena kod 362 starih i modernih sorata pšenice centralnog i istočnog SAD-a pomoću SSR markera. Sve sorte proizvedene prije 1964. g. imale su alele za divlji tip na sva tri lokusa. U preko 90% modernih pšenica identificiran je ili *Rht-B1b* ili *Rht-D1b* alel; 45% ozimih pšenica imalo je *Rht-D1b* alel, dok je 77% durum pšenica imalo *Rht-B1b* alel. Na *Xgwm261* lokusu identificirano je nekoliko alelnih varijanti, i to od 165, 175, 192, 197, 203 i 210 bp. Kod ozime pšenice najčešće alelne varijante bile su one od 165 i 210 bp, a kod durum pšenice od 165 i 175 bp. Alel od 192 bp imalo je samo osam, odnosno 3% sorata, kod ozime i durum pšenice.

Pomoću mikrosatelitnog markera *gwm261*, alelno specifičnih markera za *Ppd-D1(Ppd1), Vrn-1A* i *Vrn-1D* lokuse te test reakcije na giberelinsku kiselinu (GA), Kolev i sur. (2010.) ispitivali su distribuciju *dwarf* gena te reakciju na fotoperiod i vernalizaciju, kod 20 starih i modernih domaćih i četiri strane sorte bugarske pšenice, te 11 linija. Identificirano je nekoliko alelnih varijanti na *Xgwm261* lokusu, od 164, 174, 192, 202 i 212 bp. Stare sorte visokih stabljika uglavnom su imale alelnu varijantu od 174 bp, a moderne sorte polupatuljasti alel od 192 bp, sam ili u kombinaciji s *Rht-B1a, Rht-B1b* ili *Rht-B1d* alelima. *Ppd-D1a* alel, odgovoran za neosjetljivost na fotoperiodizam, identificiran je u 93,3%

analiziranih modernih sorata. Kod 86,6% modernih sorata identificirana je kombinacija *Ppd-D1a/vrn-A1, vrn-D1* alela za fotoperiod i vernalizaciju, koju karakterizira ranije klasanje.

Šip i sur. (2010.) proveli su ispitivanja o distribuciji alela na *Rht* i *Ppd* lokusima nekoliko različitih grupa ozime pšenice na niz agronomskih svojstava koristeći podatke iz poljskih pokusa s više lokacija. Zabilježena je znatna varijacija za sva svojstva unutar i između grupa pšenica. Identificirano je nekoliko alelnih varijanti na *Xgwm261* lokusu, od 165, 174, 192 i 198 bp. Najčešće kombinacije alela bile su *Xgwm26*- 192 bp; *Ppd-D1a* (45% sorata) i *Rht-B1b* ili *Rht-B1d; Xgwm261*-192 bp; *Ppd- D1a* (30% sorata). *Xgwm261* alel od 192 bp nije bitno utjecao na smanjivanje visine stabljike, u danim uvjetima, u usporedbi s alelnim kombinacijama od 165 bp i 174 bp. Kod sorata s GA-neosjetljivim alelom *Rht-D1b* zabilježena je najveća redukcija u visini stabljike te pozitivan utjecaj na otpornost na polijeganje i prinos.

Šip i sur. (2011.) ispitivali su prisutnost alela na *Rht* i *Ppd* lokusima ozimih sorata pšenice područja srednje Europe (Češke i Slovačke Republike) pomoću SSR markera i testa reakcije na giberelinsku kiselinu (GA). Identificirane su četiri različite alelne varijante (174, 192, 165 i 198 bp) na *Xgwm261* lokusu. Kod 85 sorata područja Češke Republike, najveću učestalost i rasprostranjenost imala je alelna varijanta od 174 bp (39), često u kombinaciji s *Ppd-D1b* (30 od 39 sorata) i *Rht-D1b* alelom (15 od 30 sorata). U Slovačkoj Republici, alelna varijanta od 192 bp, obično povezana s *Ppd-D1a* lokusom, identificirana je u 30 od 40 sorata; a u 12 sorata također u kombinaciji s GA- neosjetljivim alelom na 4B kromosomu.

Li i sur. (2011.) koristili su populaciju od 159 rekombinantnih inbred linija nastalih križanjem polupatuljaste sorte kratkih koleoptila, Rio Blanco (*Rht-b1b, Rht-D1a*), i visoke sorte dugih koleoptila, IDO444 (*Rht-B1a, Rht-D1a*), te su mapirali major QTL na *Rht-B1* lokusu. Duljina koleoptila polupatuljastih linija bila je znatno manja od visokih linija. Rezultati ukazuju na plejotropni učinak *Rht-B1* gena na smanjivanje duljine koleoptila.

Rebetzke i sur. (2012.) proizveli su četiri velike inbred populacije čiji su genotipovi ispitani pomoću molekularnih markera kako bi utvrdili potencijal GA-osjetljivih *Rht4*, *Rht5*, *Rht8*, *Rht12* i *Rht13* gena bez negativnih utjecaja na vigor klijanaca. U usporedbi s visokim genotipovima redukcija u visini stabljike bila je najveća za *Rht5* (-55%), zatim *Rht12* (-45%), *Rht13* (-34%), *Rht4* (-17%), a najmanja za *Rht8* (-7%).

Redukcija visine bila je u korelaciji sa smanjivanjem polijeganja te povećanim žetvenim indeksom i brojem zrna. Većina *Rht* gena bila je povezana s povećanjem broja zrna: *Rht13* (+27%), *Rht4* (+19%), *Rht12* (+19%). Ispitivani geni nisu imali značajni utjecaj na dužinu koleoptile i širinu lista klijanaca, ali dužina lista bila je u prosjeku manja u linijama s *Rht5* ili *Rht12* genom.

Pomoću SSR markera Kang i sur. (2012.) proveli su ispitivanje na F_2 populaciji nastaloj križanjem patuljaste poljske pšenice i visoke pšenice te identificirali recesivni gen za patuljasti rast, privremeno označen kao *Rht-dp* gen. Osam SSR markera na kratkom kraku 4B kromosoma i dva AFLP markera mapirani su relativno blizu lokusa tog gena. Alelnim testovima je utvrđeno da *Rht-dp* može biti alternativni alel *Rht-B1* lokusa.

Divashuk i sur. (2013.) su pomoću SSR markera ispitivali varijabilnost *Rht-B1b, Rht-B1e, Rht-D1b* i *Rht8* gena kod 98 sorata južne Rusije. *Rht-D1b* alel bio je prisutan u 13 sorti, *Rht-B1b* u 37, a 19 sorti imalo je *Rht-B1e* alel. Većina sorata imale su divlji tip alela na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu. Alelnu varijantu od 192 bp na *Xgwm261* lokusu imalo je 76 sorata za koje se pretpostavlja da nose Rht8 gen. Identificirano je još osam alelnih varijanti na *Xgwm261* lokusu : 174 bp, 165 bp, 196 bp, 194 bp, 202 bp, 204 bp, 211 bp i 213 bp.

Kako bi utvrdili sposobnost *Rht* gena za smanjivanje visine stabljike (*Rht-B1b, Rht-D1b, Rht8*), Lin i sur. (2014.) križali su osam patuljastih pšenica s visokim pšenicama te zabilježili velike varijacije kod F_1 biljaka. Na *Xgwm261* lokusu identificirane su tri alelne varijante, od 174, 192 i 210 bp, s najvećom učestalošću alela od 210 bp (57,7%). Elitna linija, CY925ai, kod koje su detektirana sva tri *Rht* gena (*Rht-B1b, Rht-D1b* i *Rht8*) imala je vrlo nisku stabljiku (57,92 cm) i visoku prosječnu redukciju visine od 29.4%.

Pomoću mikrosatelitnog markera *gwm261,* Worland i sur. (1998.) proveli su ispitivanje distribucije i adaptabilne značajnosti alelnih varijanti *Xgwm261* lokusa u preko 100 sorata pšenice. Većina ispitanih sorata nosila je alelne varijante od 192 , 174 i 165 bp. Pronađene su i alelne varijante veće od 200 bp, i to 201, 210 i 215 bp. Alelna varijanta od 192 bp imala je široku rasprostranjenost u južnoeuropskim i mnogim srednjeeuropskim sortama uključujući ruske pšenice Avrora, Bezostaya i Kavkaz, dok je većina britanskih, francuskih i njemačkih pšenica nosila alelnu varijantu od 174 bp na *Xgwm261* lokusu. Pšenice proizvedene u CIMMYT-u, Meksiko, imale su alelenu varijantu od 165 bp koja je povezana s povećanjem visine stabljike.

Korzun i sur. (1998.) su analizom rekombinantnih linija između 2D kromosoma sorata Ciano 67 i Mara, i Cappelle-Desprez identificirali tri alelne varijante, od 165 (Ciano 67), 174 (Cappelle-Desprez) i 192 bp (Mara), na *Xgwm261* lokusu. Ispitivanjem dodatnih 100 sorata pšenice utvrđena je njihova široka rasprostranjenost. Također je utvrđena i uska povezanost alelne varijante od 192 bp s *Rht8* lokusom, koji su udaljeni samo 0.6 cM. Pronađene su i nove alelne varijante od 201, 202, 210 i 215 bp. Smatra se da alelna varijanta od 192 bp u usporedbi sa 174 bp alelom smanjuje visinu stabljike za 7- 8 cm, dok ona od 165 bp povećava stabljiku za oko 3 cm.

Chebotar i sur. (2001.) su pomoću mikrosatelitnog markera *gwm261* ispitali 45 sorata pšenice i selekcijski materijal gen banki Ukrajine. Ispitivanje je potvrdilo da većina sorata na području južne Ukrajine nosi alelnu varijantu od 192 bp na *Xgwm261* lokusu, time ukazujući na adaptivnost ovog alela *Rht8* gena u južnim područjima.

Prema Worland i sur. (2001.) ispitivanjem varijabilnosti alela na *Xgwm261* lokusu 870 sorata pšenica pomoću SSR markera *gwm261* utvrđeno je da 90% sorata nosi alele od 165, 174 i 192 bp, dok je u ostalima identificirano deset novih alelnih varijanti (194, 195, 196, 201, 202, 203, 204, 205, 207, 210 i 215 bp). Alelna varijanta od 192 bp pronađena je u većini sorata južne Europe, a od 165 bp u većini meksičkih pšenica sa CIMMYT-a i zemalja s germplazmom CIMMYT-a u oplemenjivačkim programima. U kineskoj pšenici Chinese Spring također je identificiran alel od 192 bp iako se smatra da ona ne nosi *Rht8* gen.

Ahmad i Sorrells (2002.) proveli su ispitivanje 71 sorte pšenice iz 13 zemalja kako bi procijenili varijabilnosti na *Xgwm261* lokusu. Rezultati su pokazali da aleli sa 174 i 165 bp imaju najveću zastupljenost, od 52,11% i 26,76%. Nijedna sorta Novog Zelanda nije imala alel od 192 bp specifično vezan za *Rht8* gen, dok je samo jedna sorta SAD-a imala ovaj alel. Učestalost alela od 192 pb bila je 5,63%. Zabilježene su i nove alelne varijante od 180, 198, 200 i 204 bp u sortama SAD-a i Novog Zelanda. Nekoliko sorata SAD-a i Poljske pokazale su dvije ili tri alelne varijante istovremeno.

Bai i sur. (2004.) ispitivali su utjecaj *Rht8* gena na duljinu koleoptila pšenice u sušnim regijama s niskim količinama padalina. Analiza alelne distribucije na *Xgwm261* lokusu pokazala je da su u ispitivanim sortama SAD-a i Kine najčešće alelne varijante od 165 bp (ozime durum pšenice) i 174 bp (ozime krušne pšenice), a identificirani su i aleli od 184, 192, 194, 197, 202 i 212 bp. 64% kineskih, i oko 8% sorata SAD-a imalo je alel od 192 bp

koji ukazuje na prisutnost *Rht8* gena. Duljina koleoptila varirala je ovisno o alelima na *Xgwm261* lokusu, od 7,9 cm (165, 197 i 210 bp aleli) do 8,8 cm (192 bp alel).

Prema Liu i sur. (2005.) u 408 kineskih i 98 egzotičnih sorata pšenice zabilježeno je 13 različitih alelnih varijanti na lokusu *Rht8* gena pomoću mikrosatelitnog markera *gwm261*. Identificirane su alelne varijante od 216, 212, 210, 206, 204, 202, 200, 196, 194, 192, 190, 174 i 164 bp. Analiza distribucije alelnih varijanti pokazala je da su u kineskim sortama prevladavali 204, 192, 174 i 164 bp aleli. Najveću učestalost imao je alel od 192 bp (38,48%).

Zheleva i sur. (2006.) ispitivali su distribuciju alela mikrosatelitnog lokusa *Xgwm261* 174 sorata podrijetlom iz jugoistočne, zapadne i centralne Europe pri čemu je identificirano šest alelnih varijanti od 164, 174, 192, 194, 196 i 202 bp. Najveću učestalost (79,77%) imao je alel od 192 bp pronađen u bugarskim i drugim pšenicama jugoistočne Europe, time pokazujući značajnu važnost adaptabilnosti određenog alela *Rht8* gena na tom geografskom području. Većina genotipova pšenice zapadne i centralne Europe imale su alelne varijante od 174 i 164 bp.

U istraživanju koje su proveli Dvojković i sur. (2010.) ispitivana je alelna varijabilnost lokusa *Xgwm261* kod 98 hrvatskih i 24 stranih sorata pšenice. Alelna varijanta od 192 bp identificirana je u 84 hrvatske sorte, kao i u mnogim sortama južne Europe. Alel od 174 bp na *Xgwm261* lokusu imale su određene sorte sjeverozapadne Europe i nekoliko hrvatskih sorata. Alelnu varijantu od 165 bp imale su hrvatske sorte čije se podrijetlo može naći u izvorima koji djelomično potiču iz SAD-a i Kanade. Identificirane su i alelne varijante od 196 i 205 bp.

Petrović i sur. (2012.) analizirali su 40 ozimih sorata pšenice pomoću SSR markera *gwm261* na lokusu *Xgwm261*. 28 sorata imalo je alel od 192, šest od 174, četiri od 165 i dva od 196 bp. Alel neosjetljivosti na fotoperiod, *Ppd-D1a*, identificiran je kod 31, a alel *Ppd-D1b* kod 9 sorata. Samo tri hrvatska sorte (Ilirija, Aida i Felix) imala su alel od 174 bp koji je povezan s genom osjetljivosti na fotoperiod *ppd-D1*, i koji je introduciran u oplemenjivački program iz japanske pšenice Norin 10.

3. Materijal i metode

3.1. Biljni materijal

U istraživanje je uključeno 20 hrvatskih sorata heksaploidne krušne pšenice (*Triticum aestivum* L. *spp. vulgare*) koje su priznate od 1936. do 2010. godine. Sorte su odabrane na osnovi godine priznavanja, zastupljenosti u proizvodnji i području uzgoja (tablica 2a). U istraživanje je uključeno i deset sorata stranog podrijetla koje su poslužile kao standardi u identifikaciji *Rht* gena koji su za ove sorte utvrđeni prethodnim istraživanjima (tablica 2b).

Tablica 2.a. Godina priznavanja, podrijetlo i pedigre hrvatskih sorata ozime pšenice

	Sorta	Godina	Podrijetlo	Pedigre
1.	U1	1936.	PIO	Carlotta Strampeli/Marquis
2.	Zlatna Dolina	1971.	Bc institut	Zg 414-57/Leonardo
3.	Osječka 20	1978.	PIO	Osk. 6.9-1-64/V-188-M
4.	Slavonija	1984.	PIO	Osječka 20/Osk.4.216-2-76
5.	Žitarka	1985.	PIO	Osk. 6.30-20/Slavonka/3/Eph. M68/Osk.154 -19/ Kavkaz
6.	Ana	1988.	PIO	Osk-4.216-2-76/Zg-2877-74
7.	Srpanjka	1989.	PIO	Osk. 4.50-1-77/Zg 2696
8.	Demetra	1991.	PIO	Osk. 4.216-2-76/Zg 2877-74
9.	Cerera	1993.	Jošt	NE-7060-76-Y-342/VG-19
10.	Marija	1995.	Bc Institut	Venera/NSJP-49
11.	Kuna	1995.	AGRZG	St 563/Skopljanka
12.	Barbara	1997.	PIO	GO 3135/Žitarka
13.	Super Žitarka	1997.	PIO	GO 3135/Žitarka
14.	Golubica	1998.	PIO	Slavonija/Gemini
15.	Koleda	1998.	Jošt	NE-7060-76-Y-335/VG-19
16.	Gabi	1999.	Agrigenetics d.o.o.	Srpanjka/GK 32-82
17.	Prima	2001.	Bc Institut	Sana/Gala
18.	Janica	2003.	PIO	Osk. 5.36-9-91/Srpanjka
19.	Dea	2005.	Agrigenetics d.o.o.	Srpanjka/Brutus
20.	Nova Žitarka	2010.	PIO	FS-800/89/Žitarka

Od 20 sorata pšenice, 12 je kreirano na Poljoprivrednom institutu u Osijeku, tri pripadaju Bc institutu, Zagreb, jedna sorta Agronomskom fakultetu u Zagrebu (AGRZG), dvije oplemenjivačkoj kući Jošt sjeme- istraživanja d.o.o , Križevci i dvije oplemenjivačkoj kući

Agrigenetics d.o.o, Osijek. Od stranih sorata, po dvije sorte su podrijetlom iz Rusije i Francuske, te po jedna sorta iz Japana, Kine, Italije, Njemačke, Kanade i Meksika.

Tablica 2.b. Godina priznavanja, podrijetlo i pedigre stranih sorata pšenice

	Sorta	Godina	Podrijetlo	Pedigre
1.	Thatcher	1921.	Kanada	Marquis/Yumillo//Marquis /Kanred
2.	Norin 10	1935.	Japan	Turkey red/Fultz-Daruma
3.	Chinese Spring	-	Kina	LV/Sichuan
4.	Capelle Desprez	1946.	Francuska	Vilmorin 27/Hybride du Juncqois
5.	Libellula	1965.	Italija	Tevere/Giuliari//San Pastore
6.	Avrora	1972.	Rusija	Lutescens-314-h-147/ Bezostaya-1
7.	Kavkaz	1972.	Rusija	Lutescens-314-h-147/ Bezostaya-1
8.	Soissons	1987.	Francuska	Iena/HN 35
9.	Siete Cerros 66	1996.	Meksiko	Penjamo-62(SIB)/Gabo-55
10.	Altos	2000.	Njemačka	Kontrast/Hadmerslebener-48182-85

3.2. Metode rada

3.2.1. Poljski pokus, klimatski uvjeti i agronomsko svojstvo visine biljke

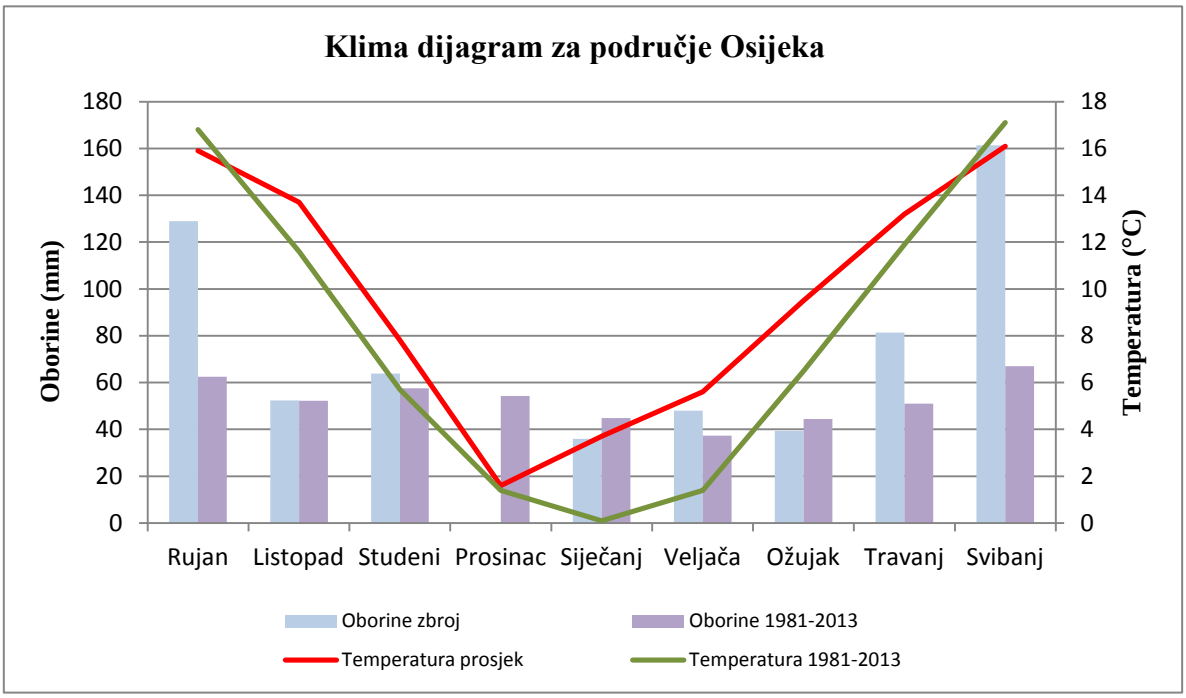
Sve sorte pšenice odabrane za istraživanje postavljene su u poljski pokus u sklopu VIP projekta „Adaptabilnost hrvatskog sortimenta pšenice u uvjetima klimatskih promjena“ tijekom vegetacijske godine 2013./2014. (slika 1). Pokus je postavljen na lokaciji Klisa kod Osijeka. Provedena je standardna agrotehnika za pšenicu. Pokus je zasijan 15. listopada 2013. godine.



Slika 1. Poljski pokus tijekom nicanja pšenice (foto original; I. Ravlić)

Svaka sorta posijana je na osnovnu parcelu dužine 5 m, širine 1,25 m, s površinom od 6,25 m^2. Razmak između redova bio je 12,5 cm.

Klimatski podatci o srednjim mjesečnim temperaturama i oborinama za razdoblje od rujna 2013. do svibnja 2014. godine, te 32-godišnji prosjek dobiveni su iz Državnog hidrometeorološkog zavoda i prikazani grafikonom 1.



Grafikon 1. Klima dijagram za područje Osijeka tijekom vegetacijske godine 2013./2014. i višegodišnji prosjek (1981.-2013.)

Tijekom vegetacijske godine 2013./2014. srednje mjesečne temperature zraka nisu odstupale od višegodišnjeg prosjeka u rujnu, prosincu i svibnju, dok su u ostalim mjesecima tijekom vegetacije pšenice temperature bile više za 2 do 3°C. U veljači su temperature zraka bile više za 4°C od višegodišnjeg prosjeka što je dovelo do ranijeg vlatanja i klasanja.

Veća količina oborina zabilježena je u predsjetvenom razdoblju, u rujnu, kada je palo dvostruko više oborina od višegodišnjeg prosjeka, 129 mm. U sjetvi pšenice količina oborina nije odstupala od višegodišnjeg prosjeka, dok je u prosincu zabilježen potpuni nedostatak oborina. U travnju je palo 30 mm, a u svibnju čak 94 mm više oborina od višegodišnjeg prosjeka što je potaknulo razvoj bolesti i polijeganje pšenice.

Agronomsko svojstvo visine biljke mjereno je tijekom pune zriobe na 25 slučajno odabranih biljaka iz sredine parcele (slika 2). Mjerenje je obavljeno 12. lipnja 2014. godine.



Slika 2. Poljski pokus u punoj zriobi pšenice (foto original; I. Ravlić)

3.2.2. Laboratorijski pokus

Ispitivanje varijabilnosti *Rht* gena na DNA razini provedeno je u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku. Prilikom ispitivanja korištena je metoda mikrosatelitnih markera bazirana na lančanoj reakciji polimerazom (PCR- Polymerase Chain Reaction).

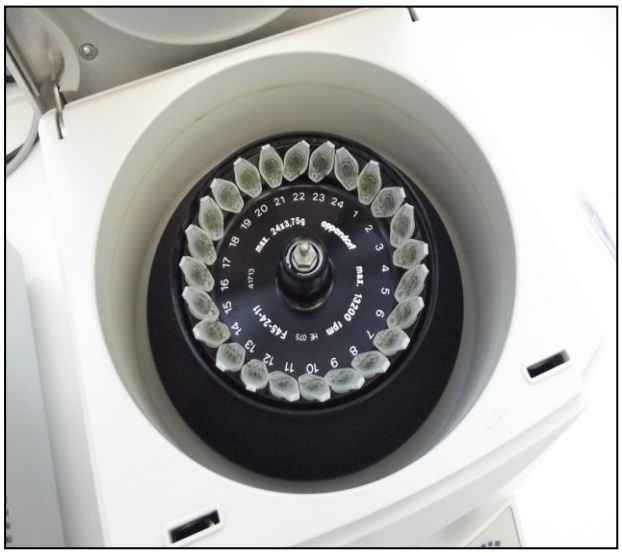
3.2.2.1. Uzgoj klijanaca i izolacija genomske DNA

Sjeme svake sorte posijano je u tresetne pločice i naklijavano u klima komori tijekom 14 dana. Temperatura u klima komori održavana je na 20°C uz svjetlosni režim 12 sati osvjetljenja i 12 sati bez osvjetljenja, uz zalijevanje svakih pet dana. Listovi biljaka prikupljeni su u fazi dva do tri lista, pohranjeni u vrećice s pripadajućim brojem te čuvani na -80°C.

Izolacija DNA iz listova 30 sorata provedena je prema cetil-trimetil-amonij-bromid metodi (CTAB) (Doyle i Doyle, 1987.), modificirana prema Grljušić (2003.). Odvagano je 20 mg listova svake sorte koji su stavljeni u tarionike prethodno ohlađene tekućim dušikom. Nakon toga su listovi preliveni tekućim dušikom i tučkom smrvljeni u fini prah. U svaki uzorak dodano je 1000 µL 2% CTAB pufera (1M Tris-HCl pH 8.0; 0,5 Na_2EDTA pH 8.0; 5 M NaCl; 10% SDS), koji je prethodno zagrijan u vodenoj kupelji na 68°C. Sadržaj je iz tarionika potom izliven u prethodno brojevima označene Eppendorf tubice od 2 ml koje su kratko vorteksirane te inkubirane na 65°C u vodenoj kupelji 45 minuta uz povremeno okretanje seta tubica rukom. Nakon inkubacije uzorci u tubicama premješteni su u posudu s ledom gdje je svakom uzorku dodano 670 µL SEVAG-a (kloroform/izoamilni alkohol 24:1). Nakon dodavanja alkohola svaki uzorak pojedinačno je protresen rukom okretanjem tubice koje su zatim stavljene na stalak za mućkanje u trajanju od 30 minuta (slika 3).

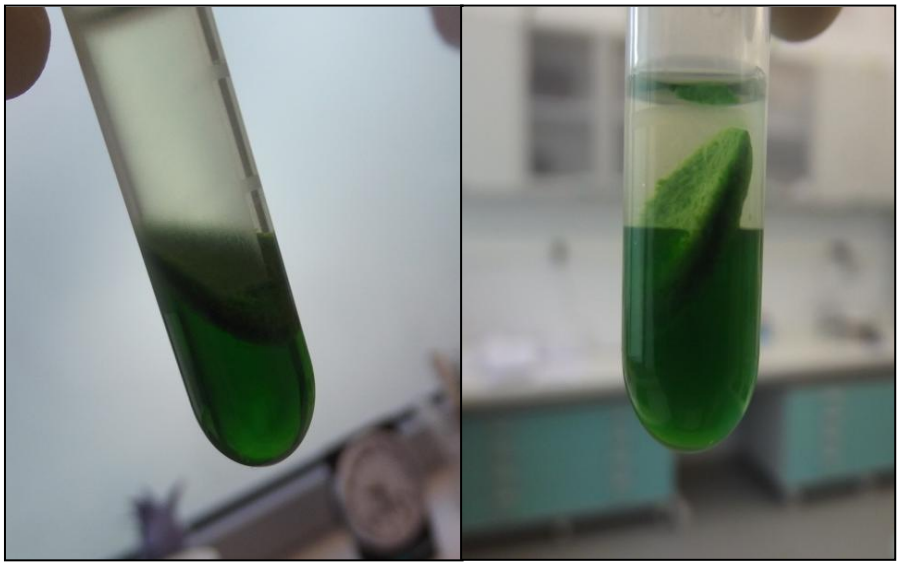


Slika 3. Uzorci na stalku za mućkanje (foto original; I. Ravlić)



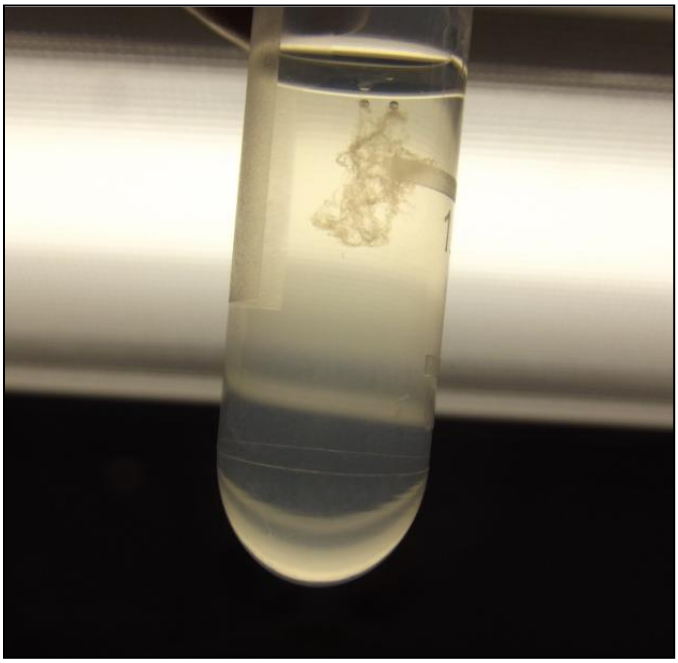
Slika 4. Centrifugiranje uzoraka (foto original; I. Ravlić)

Uzorci su nakon mućkanja na stalku centrifugirani 8 minuta brzinom od 14 000 okr/min (slika 4). Centrifugiranjem je odvojena tekuća faza od krute faze (slika 5) koja je zatim pipetom s odrezanim vrhom izdvojena u novi set označenih tubica od 2 ml. Konačni volumen tekuće faze iznosio je oko 750 µL.



Slika 5. Odvajanje tekuće od krute faze (foto original; I. Ravlić)

U izdvojenu tekuću fazu dodano je 16 µL RNAze te su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi na stalku za mućkanje 30 minuta, uz povremeno ručno okretanje. U tubice je zatim dodano 650 µL 0,7 V hladnog izopropanola te su lagano okretane rukom dok DNA nije postala vidljiva (slika 6).



Slika 6. Vidljiva DNA nakon dodavanja izopropanola (foto original; I. Ravlić)

Tubice su ostavljene na sobnoj temperaturi dva sata uz povremeno okretanje rukom nakon čega su centrifugirane 1 minutu na 14 000 okr/min. Prilikom centrifugiranja na dnu tubice se stvorila bijela peleta DNA. Tekuća faza pažljivo je izlivena, a u tubicu je dodano 500 µL 0,2 mM natrij acetata u 76% etanolu kojim je peleta prana oko 30 minuta laganim treskanjem tubice prstom. Tubice su kratko centrifugirane 2 minute pri 14 000 okr/min, a tekuća faza izlivena. Pranje peleta ponovljeno je u 500 µL amonij acetata u 76% etanolu tijekom 10 minuta. Tubice su ponovno centrifugirane 1 minutu na 14 000 okr/min i tekuća faza je izlivena.

Preostali etanol nakon izlijevanja tekuće faze pažljivo je odstranjen pipetom te su otvorene tubice ostavljene u digestoru 30 do 45 minuta. Nakon sušenja peletama je dodano 100 µL 1 × TE pufera kako bi se otopile. Tubice su kratko centrifugirane i spremljene u hladnjak na +4°C. Sljedeći dan tubice su još jednom lagano protresene prstom te su uzorci DNA pohranjeni na -20°C.

Čistoća izolirane DNA izmjerena je Varian Cary® 50 UV-Visible spektrofotometrom. Pripremljena su razrjeđenja DNA izdvajanjem 15 µL čiste DNA i 735 µL TE pufera. Na početku mjerenja uređaj je kalibriran pomoću demineralizirane H_2O. Za svaki uzorak napravljena su dva ponavljanja te je na temelju omjera apsorbance od 260 (A_{260}) i 280 nm (A_{280}) utvrđena čistoća DNA, čija je vrijednost bila prihvatljiva u rasponu od 1,5 do 1,9.

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

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

Nakon određivanja koncentracije pripremljeni su radni uzorci za PCR reakcije. Za svaki uzorak određena je količina DNA (1) i TE pufera (2) za PCR razrjeđenje 1:5 (Tablica 3) prema formulama:

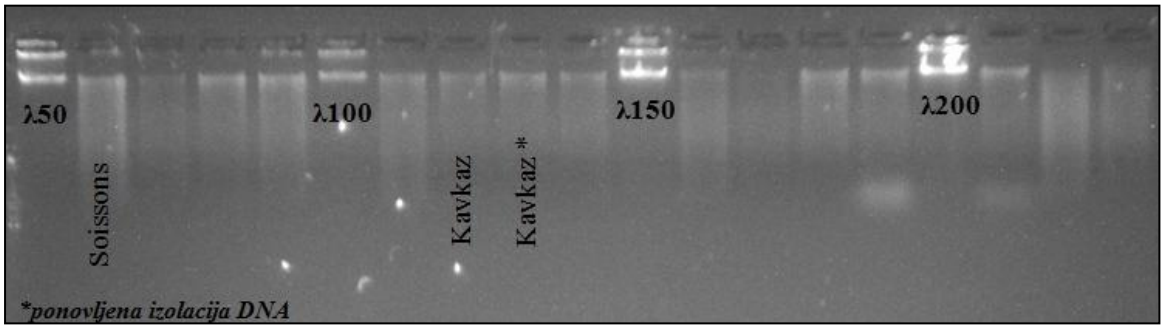
$$(1) \qquad \text{DNA } (\mu\text{L}) = \frac{20}{[\text{DNA}]} * 50$$

$$(2) \qquad \text{TE } 8.0(\mu\text{L}) = 50{,}0 - \text{DNA } (\mu\text{L})$$

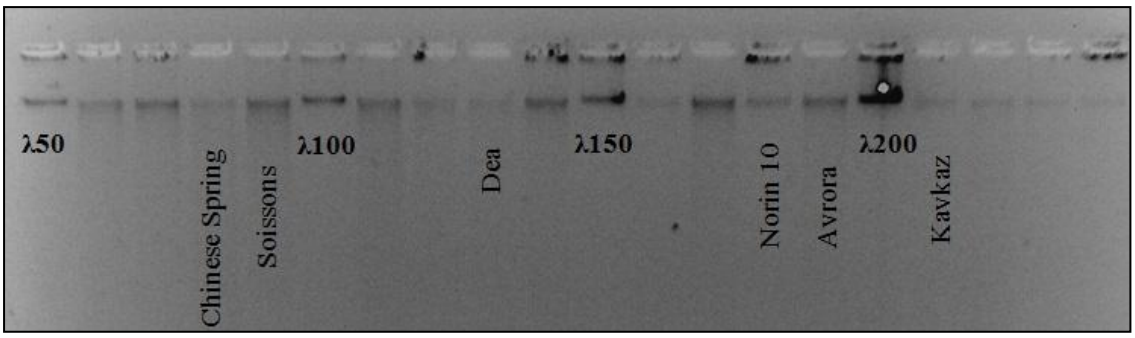
Tablica 3. Koncentracija DNA i PCR razrjeđenje uzoraka

Br.	Sorta	[DNA] ng/µl	PCR razrjeđenje 1:5 (µL)		Br.	Sorta	[DNA] ng/µl	PCR razrjeđenje 1:5 (µL)	
			DNA	TE 8.0				DNA	TE 8.0
1	U1	334,5	2,98	47,02	**16**	Koleda	566,0	1,77	48,23
2	Osječka 20	241,5	4,14	45,86	**17**	Gabi	910,3	1,1	48,9
3	Slavonija	470,5	2,13	47,87	**18**	N.Žitarka	783,5	1,28	48,72
4	Žitarka	680,75	1,47	48,53	**19**	Dea	711,3	1,41	48,59
5	Srpanjka	333,33	3,0	47,0	**20**	Ana	335,8	2,98	47,02
6	Demetra	249,8	4,0	46,0	**21**	Libellula	520,0	1,92	48,08
7	Super Žitarka	423,8	2,36	47,64	**22**	Soissons	506,3	1,98	48,02
8	Zlatna Dolina	141,5	7,07	42,93	**23**	Altos	754,5	1,33	48,67
9	Golubica	445,5	2,24	47,76	**24**	C.Spring	1414,5	0,7	49,3
10	Janica	640,5	1,56	48,44	**25**	Capelle D.	452,0	2,21	47,79
11	Barbara	357,0	2,8	47,2	**26**	Siete C.66	597,3	1,67	48,33
12	Marija	847,8	1,18	48,82	**27**	Avrora	2793,7	0,36	48,64
13	Prima	508,5	1,97	48,03	**28**	Kavkaz	562,8	1,78	48,22
14	Kuna	606,5	1,65	48,35	**29**	Norin 10	555,5	1,8	48,2
15	Cerera	573,3	1,74	48,26	**30**	Thatcher	616,8	1,62	48,38

Koncentracija DNA provjerena je elektroforezom u usporedbi s lambdom-DNA čija je koncentracija unaprijed određena (slika 7 i 8). Pripremljen je 0,75% agarozni gel u 1 × TAE puferu na koji su nanošeni uzorci pomoću pipete. Za pripremu uzoraka za elektroforezu korišteno je 3 µL razrijeđene DNA, 2 µL STOP miksa (5 × SGB) (1M Tris-HCl pH 8.0; 0,5 M Na_2EDTA; Bromfenolblue boja; 87%- tni glicerin; SDS) i 2 µL d.d. H_2O. Za uzorke lambde-DNA uzeto je 1 µL λ-DNA, 2 µL Stop miksa i 7 µL d.d. H_2O. Uvjeti elektroforeze bili su sljedeći: 80 V; 60 mA; 50 W.



Slika 7. Kvaliteta izolirane DNA u usporedbi s lambdom-DNA (foto original; I. Ravlić)



Slika 8. Kvaliteta izolirane DNA u usporedbi s lambdom-DNA (foto original; I. Ravlić)

Za uzorke koji su pokazali lošu kvalitetu spektrofotometrijskom analizom i elektroforezom s lambdom-DNA ponovljena je izolacija DNA.

3.2.2.2. Metoda mikrosatelitnih markera

U ispitivanju varijabilnosti *Rht* gena pšenice korištene su tri različite sekvence parova mikrosatelitnih početnica, dva para na D i jedan na B genomu pšenice.

Mikrosatelitne početnice *gwm261* markera kreirali su Marion Röder i suradnici u Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Getersleben, Njemačka. Odabrani su prema literaturnim navodima Röder i sur. (1998.). Kromosomska lokacija (lokus), sekvence početnica i temperatura nalijeganja početnica prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Svojstva para početnica mikrosatelitnog markera *gwm261*

Marker	**Lokus**	**Sekvenca početnice (5' → 3')**		**T_a (°C)***
		Lijeva početnica	**Desna početnica**	
gwm261	2D	CTCCCTGTACGCCTAAGGC	CTCGCGCTACTAGCCATTG	55

*** T_a (°C) –** temperatura nalijeganja početnica

Amplifikacija *gwm261* mikrosatelitnih početnica obavljena je prema modificiranom MAS Wheat protokolu. Prije amplifikacije pristupilo se optimizaciji PCR reakcije kroz promjene temperaturnih uvjeta reakcije kao i odabir koncentracije i količine amplifikacijskih reagensa.

Reakcijska smjesa za PCR sastojala se od amplifikacijskih reagensa, mikrosatelitnih početnica i genomske DNA, čije su koncentracije i volumeni navedeni u tablici 5.

Tablica 5. Koncentracije i sastav reakcijske smjese za PCR amplifikaciju *gwm261* početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po jednoj reakciji**
	ishodišna	radna	
PCR pufer	5 ×	1 ×	2 μL
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,6 μL
dNTP Mix	2,5 mM	0,2 mM	0,8 μL
L- početnica	10 μL	0,4 μL	0,4 μL
R- početnica	10 μL	0,4 μL	0,4 μL
Taq polimeraza	5 U/μL	0,05 U/μL	0,1 μL
Genomska DNA	2 μL		2 μL
d.d. H_2O	-	-	4,21 μL
Total			10,0 μL

Za PCR reakciju korišten je uređaj Eppendorf Mastercycler® Thermal Cyclers 53333 Version 20.30.33-09 prema sljedećem programu: 1. korak 5 minuta na 94°C; 2. korak 44 ciklusa od 50 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 54°C i 1 minuta na 72°C; te 3. završni korak 10 minuta na 72°C.

Nakon amplifikacije, produkti PCR reakcije provjeravani su elektroforezom na 2 % agaroznom gelu, a očekivane veličine fragmenata bile su 192 bp (dijagnostični alel za *Rht8* gen), te 165, 174, 180, 198, 200 i 204 bp (divlji aleli).

Specifične mikrosatelitne početnice markera za *Rht-B1* i *Rht-D1* gen kreirali su Ellis i suradnici te su odabrane prema literaturnim navodima istih (Ellis i sur., 2002.). Sekvence početnica za identifikaciju specifičnog alela, kao i lokus i temperatura nalijeganja početnica, prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Svojstva parova početnica specifičnih mikrosatelitnih markera

***Rht*-alel**	**Lokus**	**Sekvenca početnice (5' → 3')**		**T_a (°C)***
		Lijeva početnica	**Desna početnica**	
B1a	4B	**BF:** GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG	**WR1:** CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTG	70
B1b	4B	**BF:** GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG	**MR1:** CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTA	69
D1a	4D	**DF2:** GGCAAGCAAAAGCTTCGCG	**WR2:** GGCCATCTCGAGCTGCAC	55
D1b	4D	**DF:** CGCGCAATTATTGGCCAGAGATAG	**MR2:** CCCCATGGCCATCTCGAGCTGCTA	61

*** T_a (°C) –** temperatura nalijeganja početnica

Amplifikacija specifičnih mikrosatelitnih početnica za identifikaciju *Rht-B1* i *Rht-D1* gena obavljena je prema modificiranom protokolu koji su opisali Ellis i sur. (2002.). Prije pripreme reakcijske smjese, i u ovom slučaju obavljena je optimizacija PCR reakcije. Koncentracije za reakcijsku smjesu navedeni su u tablici 7.

Tablica 7. Koncentracije i sastav reakcijske smjese za PCR amplifikaciju specifičnih početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po jednoj reakciji**
	ishodišna	radna	
PCR pufer	5 ×	1 ×	2 µL
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,6 µL
dNTP Mix	2,5 mM	0,15 mM	0,6 µL
L- početnica	10 µL	0,25 µL	0,25 µL
R- početnica	10 µL	0,25 µL	0,25 µL
Taq polimeraza	5 U/µL	0,02 U/µL	0,04 µL
Genomska DNA	2 µL		2 µL
d.d. H_2O	-	-	3,704 µL
Total			10,0 µL

PCR reakcija provedena je prema sljedećem programu: 1. korak 5 minuta na 95°C; 2. korak sedam ciklusa od 45 sekundi na 95°C, 1 minuta na 65°C (-1°C po ciklusu) i 80 sekundi na 72°C; 3. korak 30 ciklusa 15 sekundi na 94°C, 15 sekundi na 58°C i 50 sekundi na 72°C; 4. završni korak trajao je 2 minute na 72°C.

Provjera PCR produkata izvršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Očekivani fragmenti produkata su veličine 237 bp za BF-MR1 i BF-WR1 , i 254 i 264 bp za DF-MR2 i DF2-WR2 početnice (tablica 8).

Tablica 8. Očekivani produkti PCR reakcije za *Rht-B1* i *Rht-D1* specifične početnice

	Aleli			**Aleli**	
Početnice	*Rht-B1a* (divlji tip)	*Rht-B1b* (patuljasti tip)	**Početnice**	*Rht-D1a* (divlji tip)	*Rht-D1b* (divlji tip)
BF-MR1	-	273 bp	**DF-MR2**	-	254 bp
BF-WR1	273 bp	-	**DF2-WR2**	264 bp	-
	Očekivani fragmenti			**Očekivani fragmenti**	

Prije pripreme reakcijskih smjesa za PCR obavljeno je razrjeđivanje oligonukleotidnih početnica dodavanjem TE pufera prema tablici 9. U pripremljene obilježene tubice od 0,5 ml dodano je 10 µL razrijeđenih oligonukleotida i 100 µL d.d. H_2O.

Tablica 9. Razrjeđivanje oligonukleotidnih početnica

Početnice markera	**TE 8.0 (µL)**
gmw261 – L	119
gmw261 – R	118
Rht-B1a – BF	88
Rht-B1a – WR1	94
Rht-B1b – BF	88
Rht-B1b –MR1	92
Rht-D1a –DF2	103
Rht-D1a –WR2	94
Rht-D1b –DF	82
Rht-D1b – DF2	122

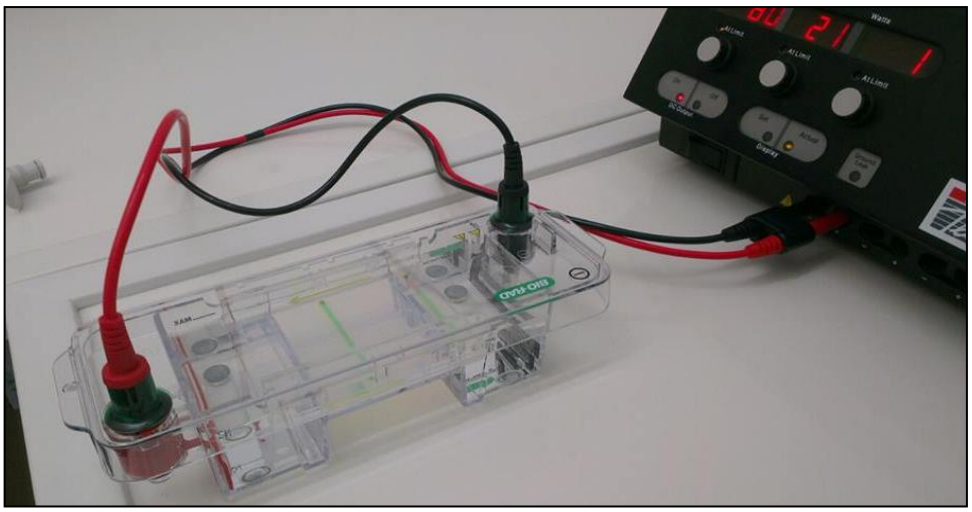
3.2.2.3. Elektroforeza

Produkti SSR amplifikacije naneseni su na 2% agarozni gel u 1 × TBE puferu. Od svakog uzorka u jažice gela ispipetirano je 5 µL. Agarozni gel bio je veličine 7×10 cm, i debljine 1

cm, a za pripremu 2%-tnog gela je bilo potrebno: 60 ml 1 × TBE pufera i 1,2 g agaroze. Za PCR produkte *gwm261* amplifikacije korištena je Lonza MetaPhor® agaroza zbog veće rezolucije produkata, dok je za ostale PCR produkte korištena Lonza SeaKem® LE agaroza.

Gelovi su pripremljeni prema sličnom protokolu: u Erlenmeyerovu tikvicu od 200 mL izvagano je 1,2 g agaroze te je dodano 60 ml TBE pufera. Tikvica je zagrijavana u mikrovalnoj pećnici dvije do tri minute do vrenja, tijekom čega je nekoliko puta izvađena i lagano miješana. Nakon toga je ohlađena miješanjem na oko 60°C na sobnoj temperaturi ili u vodenoj kupelji. Otopina agaroze obojana je s dvije do tri kapi fluorescentne Olerup SSP® GelRed boje kako bi fragmenti DNA bili vidljivi na gelu. Gel je izliven u kadicu u koju su smještena dva češlja od 15 jažica te ostavljen da se hladi na sobnoj temperaturi dok se ne stvrdne. Kod MetaPhor® agaroze gel je stavljen 20 minuta na temperaturu od +4°C kako bi se stvrdnuo.

Za elektroforezu je korišten uređaj Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT (slika 9), a uvjeti su bili sljedeći: 80 V; 60 mA; 50 W. Trajanje elektroforeze bilo je između 35 i 45 min, ovisno o veličini očekivanih fragmenata. Kao standard za utvrđivanje veličine fragmenata PCR produkata korištene su Promega® 100bp DNA Ladder s rasponom veličina fragmenata od 100 bp do 1000 bp, zajedno s pripadajućom bojom, 6x Blue/Orange Loading Dye, i Lonza® 20 bp DNA Ladder s rasponom veličina fragmenata od 20 bp do 500 bp, za veću rezoluciju produkata.



Slika 9. Elektroforeza produkata PCR reakcije (foto original; I.Ravlić)

Slike gela s PCR produktima dobivene su pomoću Syngene® uređaja za snimanje s kamerom od 3.8m piksela, G:BOX F3, s ugrađenim GeneSys softverom.

3.2.3. Očitavanje rezultata i obrada podataka

Očitavanje rezultata PCR reakcija obavljeno je Syngene® programom GeneTools, kompatibilnim s GeneSys softverom ver. 1.4.1.0, i ocjenjivanjem slika gela koje su dobivene pomoću G:BOX F3 uređaja za snimanje (slika 10). Izrađene su tablice prisutnosti gena za svaku sortu te je izračunata srednja vrijednost visine biljaka pšenice iz poljskog pokusa.

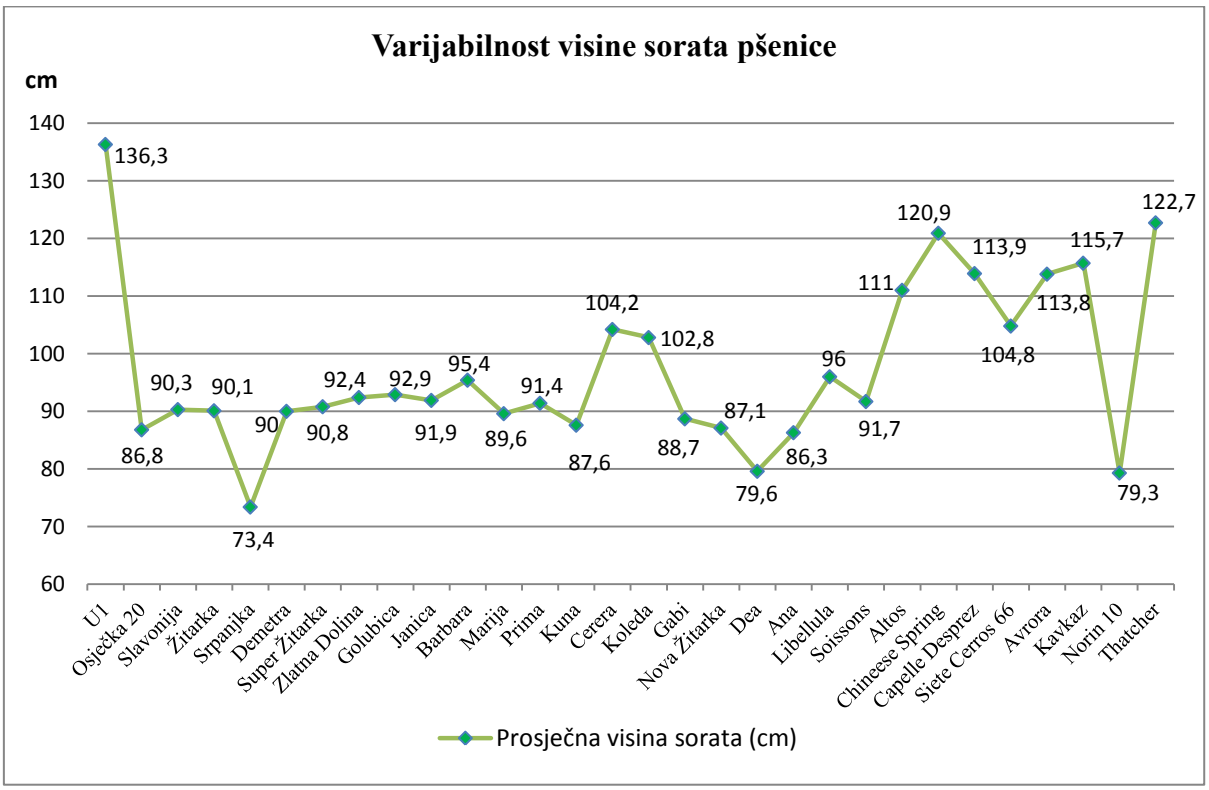


Slika 10. G:Box uređaj za snimanje gela nakon elektroforeze

4. Rezultati

4.1. Varijabilnost visine sorata pšenice u poljskom pokusu

Prosječna visina sorata pšenice varirala je od 73 do 137 cm (grafikon 2). Od svih 30 sorata uključenih u poljski pokus, najmanja visina zabilježena je kod hrvatske sorte Srpanjka, 73,4 cm, a najveća kod hrvatske sorte U1, 136,3 cm. Ostale hrvatske sorte imale su visinu između 79 i 96 cm, osim sorti Cerera i Koleda s visinom od 104,2 cm i 102,8 cm. Od stranih sorti, najmanju visinu imala je japanska pšenica Norin 10, 79,3 cm, a najveću kanadska pšenica Thatcher, 122,7 cm. Osim sorata Soissons s 91,7 cm i sorte Libellula s 96 cm, ostale strane sorte imale su visinu između 104 i 121 cm.



Grafikon 2. Prosječna visina sorata pšenice u poljskom pokusu

4.2. Ispitivanje varijabilnosti na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu

Nakon obrade slika gelova s PCR produktima u GeneTools programu, identificirani su aleli *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusa na kratkom kraku 4B i 4D kromosoma 20 hrvatskih i 10 stranih sorata pšenice te su rezultati navedeni u tablici 10.

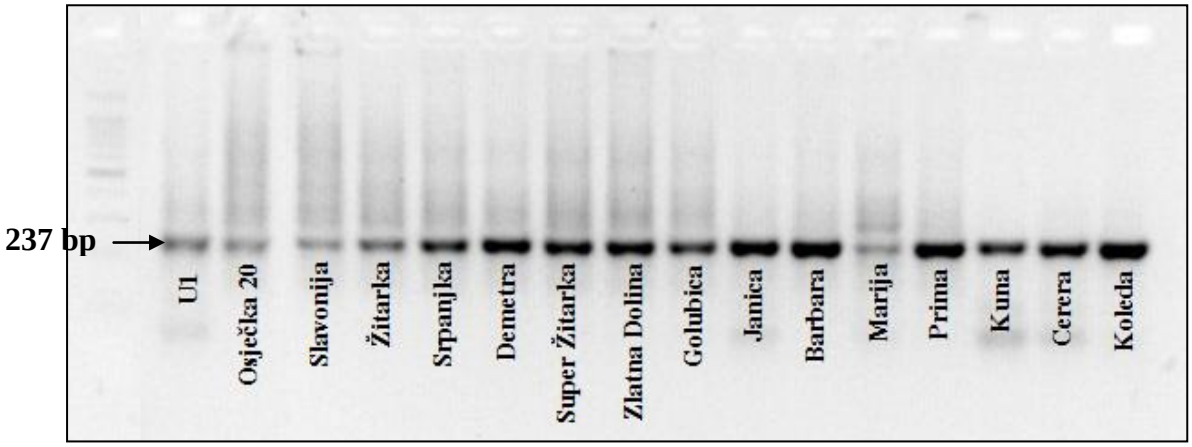
Tablica 10. Varijabilnost na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusima 30 sorata pšenice

Br.	**Sorta**	**Podrijetlo**	***Rht-B1* lokus**		***Rht-D1* lokus**	
			Aleli			
			B1a (divlji)	***B1b (patuljasti)***	***D1a (divlji)***	***D1b (patuljasti)***
1	U1	HR	+			+
2	Osječka 20	HR	-	-		+
3	Slavonija	HR	-	-		+
4	Žitarka	HR		+	-	-
5	Srpanjka	HR		+		+
6	Demetra	HR		+		+
7	Super Žitarka	HR		+		+
8	Zlatna Dolina	HR		+		+
9	Golubica	HR		+		+
10	Janica	HR		+		+
11	Barbara	HR		+		+
12	Marija	HR	+		+	
13	Prima	HR	+	+		+
14	Kuna	HR		+		+
15	Cerera	HR		+	-	-
16	Koleda	HR		+		+
17	Gabi	HR		+		+
18	N.Žitarka	HR		+		+
19	Dea	HR		+	-	-
20	Ana	HR		+		+
21	Libellula	IT	+			+
22	Soissons	FR		+	-	-
23	Altos	D	+			+
24	C.Spring	CHN	+			+
25	Capelle D.	FR	+			+
26	Siete C.66	MEX		+		+
27	Avrora	RUS	+		-	-
28	Kavkaz	RUS	+		-	-
29	Norin 10	JAP		+	-	-
30	Thatcher	CAN	+		-	-

* +/- prisutnost/odsutnost alela na lokusu

Sorte s *Rht-B1a* i *Rht-B1b* alelima dale su očekivane PCR produkte od 237 bp (slika 11).

Od ukupno 30 sorata, kod 19 je identificiran *Rht-B1b* alel na *Rht-B1* lokusu (tablica 10; slika 11). *Rht-B1b* alel imale su sve hrvatske sorte pšenice osim U1, Osječke 20, Slavonije i Marije. Alel *Rht-B1a* identificiran je kod dvije hrvatske sorte (U1 i Marija). Kod sorte Prima identificirana su oba alela nakon amplifikacije PCR produkata, dok sorte Osječka 20 i Slavonija nisu pokazale nijedan od navedenih alela. Od deset stranih standardnih sorata samo tri su imale *Rht-B1b* alel (Soissons, Ciete Cerros 66 i Norin 10), a ostale *Rht-B1a* alel. Ovaj alel identificiran je i kod sorate Altos što nije objavljeno u prijašnjim istraživanjima.

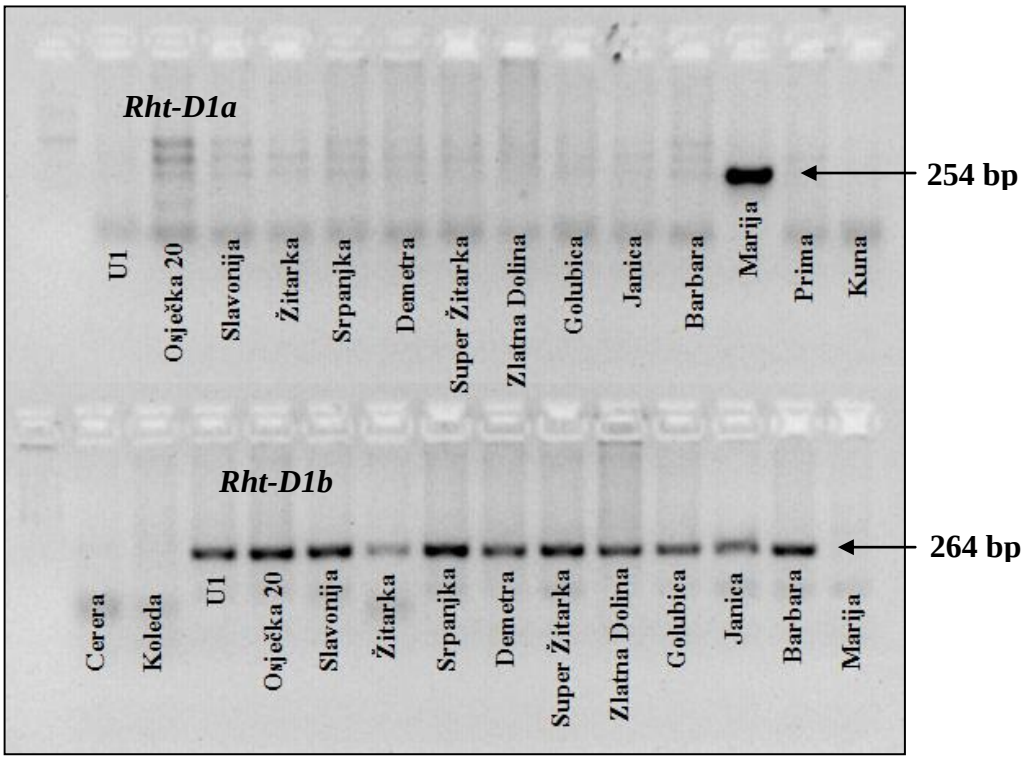


Slika 11. Identifikacija *Rht-B1b* alela kod hrvatskih sorata pšenice (foto original; I.Ravlić)

Očitavanjem rezultata za *Rht-D1* specifične markere dobiveni su očekivani PCR produkti od 254 bp za *Rht-D1a* i 264 bp za *Rht-D1b* alel (slika 12).

Kod 21 sorte pšenice identificiran je *Rht-D1b* alel na *Rht-D1* lokusu. Alel *Rht-D1b* identificiran je kod svih hrvatskih sorata, osim Žitarke, Dee, Cerere i Marije. Sorta Marija imala *Rht-D1a* alel, a sorte Žitarka, Cerera i Dea nisu imali nijedan od ova dva alela na *Rht-D1* lokusu, kao ni strana standardna sorta Soissons. Nijedan od *Rht-D1* alela nije identificiran ni kod sorti Avrora, Kavkaz i Thatcher, te Norin 10, iako je prethodnim istraživanjima u ovim sortama identificiran *Rht-D1a*, odnosno *Rht-D1b* alel. Od ostalih standardnih sorti, sorta Libellula imala je *Rht-D1b* alel, kao i sorte Altos i Capelle Desprez

za koje ovi aleli nisu pronađeni u drugim istraživanjima. Sorte Chinese Spring i Siete Cerros 66 imale su alel *Rht-D1b* iako je istraživanjima kod ovih sorti potvrđen *Rht-D1a* alel na *Rht-D1* lokusu (tablica 10; slika 12).



Slika 12. Identifikacija alela *Rht-D1* lokusa kod hrvatskih i stranih sorata pšenice (foto original; I.Ravlić)

Kod 13 sorata pšenice identificirana su oba patuljasta alela za nisku stabljiku, *Rht-B1b* i *Rht-D1b*, dok je oba divlja tipa alela na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu imala hrvatska sorta Marija. Kombinaciju *Rht-B1a* i *Rht-D1b* alela imale su sorte U1, Libellula, Altos, Chinese Spring i Capelle Desprez. Hrvatske sorte Osječka 20, Slavonija, Žitarka, Cerera i Dea, te strane sorte Soissons, Avrora, Kavkaz, Norin 10 i Thatcher, imale su samo jedan alel na oba lokusa. Hrvatska sorta Prima imala je kombinaciju *Rht-B1a*, *Rht-B1b* i *Rht-D1b* alela.

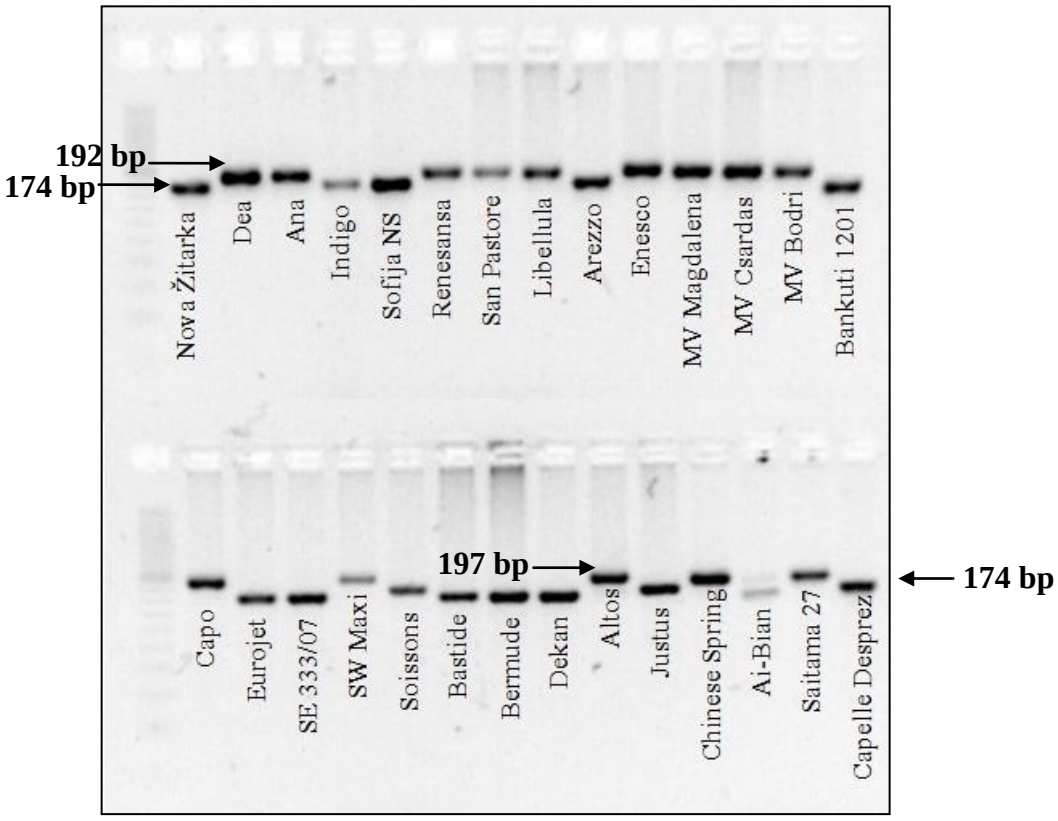
4.3. Ispitivanje varijabilnosti na *Xgwm261* lokusu

U ispitivanju varijabilnosti na *Xgwm261* lokusu koji je udaljen 0.6 cM od *Rht8* gena na kratkom kraku 2D kromosoma pšenice, korišten je mikrosatelitni marker *gwm261*. Identificirane su četiri različite alelne varijante kod 20 hrvatskih i 10 stranih sorata pšenice (tablica 11).

Tablica 11. Alelna varijabilnost na lokusu *Xgwm261* kod 20 hrvatskih i 10 stranih sorata pšenice

Br.	**Sorta**	**Podrijetlo**	**Alel na *Xgwm261* lokusu**	**Br.**	**Sorta**	**Podrijetlo**	**Alel na *Xgwm261* lokusu**
1	U1	HR	165 bp	**16**	Koleda	HR	192 bp
2	Osječka 20	HR	165 bp	**17**	Gabi	HR	192 bp
3	Slavonija	HR	192 bp	**18**	N.Žitarka	HR	174 bp
4	Žitarka	HR	192 bp	**19**	Dea	HR	192 bp
5	Srpanjka	HR	192 bp	**20**	Ana	HR	192 bp
6	Demetra	HR	192 bp	**21**	Libellula	IT	192 bp
7	Super Žitarka	HR	192 bp	**22**	Soissons	FR	174 bp
8	Zlatna Dolina	HR	192 bp	**23**	Altos	D	197 bp
9	Golubica	HR	192 bp	**24**	C.Spring	CHN	192 bp
10	Janica	HR	192 bp	**25**	Capelle D.	FR	174 bp
11	Barbara	HR	192 bp	**26**	Siete C.66	MEX	192 bp
12	Marija	HR	192 bp	**27**	Avrora	RUS	192 bp
13	Prima	HR	192 bp	**28**	Kavkaz	RUS	192 bp
14	Kuna	HR	192 bp	**29**	Norin 10	JAP	174 bp
15	Cerera	HR	192 bp	**30**	Thatcher	CAN	165 bp

Alel od 192 bp imalo je ukupno 22 sorte, od kojih je 17 hrvatskih sorata te strane sorte Libellula, Chinese Spring, Siete Cerros 66, Avrora i Kavkaz. U četiri sorte utvrđen je alel od 174 bp, od kojih je jedna hrvatska (Nova Žitarka), jedna japanska (Norin 10) i dvije francuske sorte (Soissons i Capelle Desprez 66). Alel od 165 bp imale su dvije hrvatske sorte (U1 i Osječka 20) te kanadska sorta Thatcher. Kod sorte Altos identificiran je alel od 197 bp (tablica 11; slika 13).



Slika 13. Alelna varijabilnost na lokusu *Xgwm261* kod hrvatskih i stranih sorata pšenica (foto original; I.Ravlić)

5. Rasprava

Glavni cilj oplemenjivanja pšenice u posljednjih 100 godina bilo je povećanje prinosa kroz smanjivanje visine stabljike, što je povećalo otpornost biljaka na polijeganje. Smanjivanje visine biljke dovelo je i do povećanja žetvenog indeksa kroz učinkovitije usmjeravanje asimilata za razvoj zrna. Visina biljke kontrolirana je *Rht* major genima i većim brojem minor gena raspoređenih po svim kromosomima pšenice (Chebotar i sur., 2001.) koji se mogu identificirati molekularnim markerima i tako primijeniti u oplemenjivačkim programima. U provedenom istraživanju korištena su tri mikrosatelitna markera za ispitivanje varijabilnosti *Rht* gena na B i D genomu 20 hrvatskih i 10 stranih sorata pšenice.

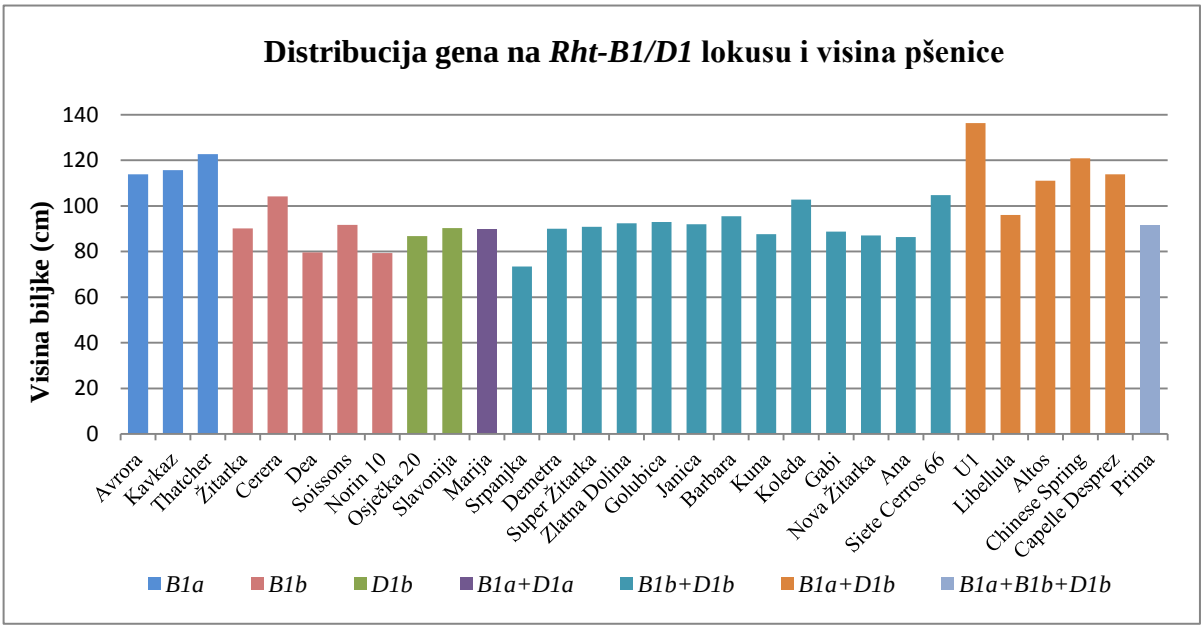
5.1. Varijabilnost na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu i visina pšenice

Za procjenu varijabilnosti sorata na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusima korišteni su specifični mikrosatelitni markeri za *Rht-B1* i *Rht-D1* gene koje su razvili Ellis i sur. (2002.) Rezultati istraživanja varijabilnosti na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu 30 sorata pšenice pokazali su da 19 sorti (63,3%) ima *Rht-B1b* alel, dok 21 sorta (70%) ima *Rht-D1b* alel. *Rht-B1b* i *Rht-D1b* aleli bili su podjednako zastupljeni kod hrvatskih sorata pšenice (kod 16 od 20 sorata, odnosno 80%). Kombinaciju oba alela imalo je 13 sorata (43,3%), od kojih je 12 hrvatskih (60%). Ovi geni introducirani iz japanske sorte Norin 10 najveću učestalost imaju u oplemenjivačkom materijalu CIMMYT-a, *Rht-B1b* 82,1 % i *Rht-D1b* 14.4% (Liang i sur., 2009.), i SAD-a, *Rht-B1b* 77% i *Rht-D1b* 45% (Guedira i sur., 2010.). Učestalost ovih gena nešto je manja u sortama područja Kine, *Rht-B1b* 24,5% i *Rht-D1b* 45%, (Zhang i sur., 2006.); Rusije, *Rht-B1b* 37,7% i *Rht-D1b* 13,3%, (Divashuk i sur., 2013.); i Njemačke, *Rht-B1b* 6% i *Rht-D1b* 37,6% (Knopf i sur., 2008.). U pšenicama područja Srbije učestalost *Rht-B1b* alela bila je 40%, a *Rht-D1b* 22% (Tošović-Marić i sur., 2008.). Worland i sur. (1998.) navode da je u germplazmi jugoistočne Europe vrlo mala učestalost ovih gena zbog negativne interakcije tih gena s pojavom visokih temperatura u vrijeme stvaranja gametofita pšenice čime je produktivnost klasa smanjena. Veća učestalost ovih gena u hrvatskim sortama može se objasniti relativno malim brojem sorata uključenih u istraživanje u čijim se pedigreima nalazi oplemenjivački materijal CIMMYT-a i SAD-a.

Iako su aleli *Rht-B1b* i *Rht-D1b* introducirani iz japanske sorte Norin 10 tijekom „Zelene revolucije“ (Hedden, 2003.) te potvrđeni drugim istraživanjima (Gale i sur., 1981.; Worland i sur., 1998.), rezultatima nije utvrđen *Rht-D1b* alel na *Rht-D1* lokusu. Isto tako,

kod kineske sorte Chinese Spring i meksičke sorte Siete Cerros 66 nije identificiran divlji alel *Rht-D1a* potvrđen prethodnim istraživanjima (Gale i sur., 1981.; Ellis i sur., 2002., McIntosh i sur., 2012.), već *Rht-D1b* alel na *Rht-D1* lokusu. Kod stranih sorti Avrora, Kavkaz i Thatcher također nije identificiran prethodno potvrđen *Rht-D1a* alel (Worlan i sur., 1998; Ellis i sur., 2002.; Divashuk i sur., 2013.). Kod njemačke sorte Altos identificirani su *Rht-B1a* i *Rht-D1b* aleli što je u suprotnosti s istraživanjem koje su proveli Knopf i sur. (2008.) koji u ovoj sorti nisu identificirali nijedan od alela odgovornih za patuljasti rast. Ovakvi rezultati mogu sugerirati na nespecifičnost primjenjenih markera, odnosno nespecifično vezanje 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 se slučaju prilikom PCR reakcije mogu amplificirati fragmenti DNA iste veličine kao i ciljani fragmenti koji će biti vidljivi na gelu nakon elektroforeze. Ovakve slučajeve navode i Tošović-Marić i sur. (2008.) te Yang i Liu (2006.).

Korištenjem *Rht* gena u oplemenjivačkim programima, visine pšenica smanjene su sa 150 cm na prosječnih 70 cm za intenzivnu poljoprivrednu proizvodnju. Smanjivanje visine bio je značajan korak i u domaćim oplemenjivačkim programima u stvaranju polupatuljastih genotipova (Bede, 1994.). Kako bi se dodatno potvrdila prisutnost određenih alela na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusima izmjerene su visine ispitivanih sorata pšenice. Visina biljke u odnosu na distribuciju alela na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu prikazana je grafikonom 3.



Grafikon 3. Distribucija alelnih varijanti *Rht-B1* i *Rht-D1* gena i visina sorata pšenice

Sorte s identificiranim divljim alelom *Rht-B1a* imale su očekivane visine preko 100 cm, iako u njima nije pronađen *Rht-D1a* alel utvrđen prethodnim istraživanjima (Worland i sur., 1998.; Ellis i sur., 2002.; Divashuk i sur., 2013.) koji bi dodatno potvrdio izmjerenu visinu stabljike. Sorte s *Rht-B1b* i/ili *Rht-D1b* alelom, među kojima je bila i Srpanjka (73,4 cm), imale su prosječnu visinu od 90 cm koja se smatra visinom prilagođenom za intenzivnu poljoprivrednu proizvodnju. Iznimke su bile sorte Cerera, Koleda i Siette Cerros 66 s visinama preko 100 cm. Ovi rezultati mogu se objasniti već spomenutim nespecifičnim markerima, budući da su Ellis i sur. (2002.) kod sorte Siette Cerros 66 utvrdili prisutnost divljeg *Rht-D1a* alela koji bi bio odgovoran za visoku stabljiku. Isto tako, visoke temperature tijekom siječnja i veljače koje su bile veće za 3-4°C od prosjeka, kao i nedostatkak oborina u prosincu mogli su utjecati na veće usmjeravanje asimilata za intenzivniji razvoj stabljike. Sorte s kombinacijom *Rht-B1a* i *Rht-D1b* alela imale su očekivane visine od 96 do 137 cm s obzirom na prisutnost *Rht-B1a* alela, kao i sorta Prima, no moguća nespecifičnost markera može se potvrditi rezultatima prijašnjih istraživanja gdje su kod sorata Chinese Spring i Capelle Desprez identificirana oba divlja alela (McIntosh i sur., 2012.). Sorta Marija s kombinacijom *Rht-B1a* i *Rht-D1a* imala je prilično nisku visinu od 89,6 cm koja ne odgovara posjedovanju oba divlja alela, što se opet može pripisati nespecifičnim markerima. Razlog u neslaganja distribucije gena i visine može biti i posljedica mutacija uslijed samooplodne prirode pšenice gdje je učestalost mutacija prilikom svake generacije 10^{-6} (Borojević, 1981.).

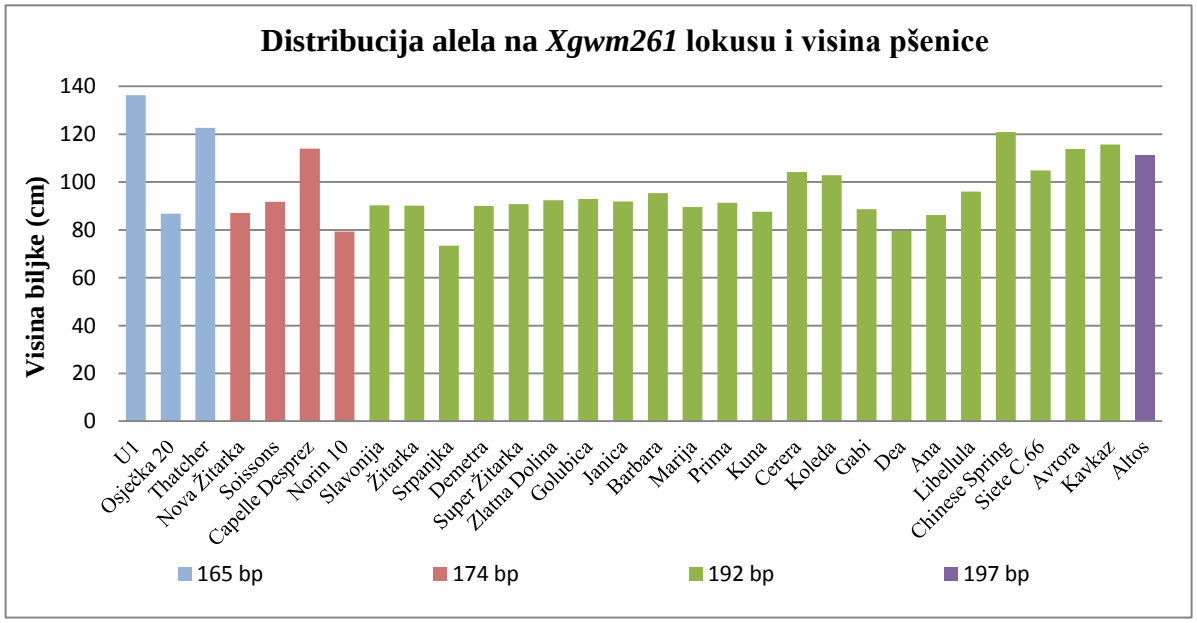
U usporedbi s divlji alelima, *Rht-B1b* i *Rht-D1b* aleli odgovorni su za prosječno smanjivanje visine stabljike za 20-25% (Rebetzke i sur., 2012.; Divashuk i sur., 2013.), a time i povećanje prinosa, iako njihovo djelovanje može biti povezano s negativnim utjecajima na morfološka i agronomska svojstva pšenice u sušnim mediteranskim uvjetima. S obzirom na postupno povećavanje prosječnih mjesečnih temperatura na našim područjima, posebice u vegetaciji pšenice, potrebno su daljnja istraživanja varijabilnosti na lokusima *Rht-B1* i *Rht-D1b* gena većeg broja sorata, kao i procjena utjecaja ovih gena na različita morfološka i agronomska svojstva pšenice. Isto tako, potreban je daljnji razvoj molekularnih markera koji će omogućiti precizniju identifikaciju ovih gena.

5.2.Varijabilnost na *Xgwm261* lokusu i visina pšenice

U istraživanju varijabilnost na *Xgwm261* lokusu, udaljenom 0,6 cM od *Rht8* gena, korišten je mikrosatelitni marker *gwm261*. Alel duljine 192 bp imale su 22 sorte (73,3%), među kojima su Libellula, Avrora, Kavkaz, Chinese Spring i Siete Cerros 66, kod četiri sorte (13,3%) utvrđen je alel od 174 bp, među kojima su i Soissons i Norin 10, te kod tri sorte (10%) alel od 165 bp među kojima je bila sorta Thatcher. Ovi rezultati slažu se s prijašnjim istraživanjima Worland i sur. (1998.), Ahmad i Sorrells (2002.), Liu i sur. (2005.), Dvojković, 2009., Petrović (2011.). Identificiran je i alel od 197 bp kod sorte Altos što su potvrdili i Knopf i sur. (2008.). 17 (85%) hrvatskih sorata imalo je alel od 192 bp na *Xgwm261* lokusu, među kojima su bile sorte Cerera, Koleda i Gabi koje nisu objavljene u dosadašnjim istraživanjima. Ovaj alel koji se smatra dijagnostičkim za prisutnost *Rht8* gena kao i gen neosjetljivosti na fotoperiod, *Ppd-D1*, introducirani su iz japanske sorte Akakomugi, a kasnije i iz talijanskih i ruskih sorata San Pastore, Libellula, Bezostaja, Avrora i Kavkaz (Borojević i Borojević, 2005.a; Borojević i Borojević, 2005.b; Salvi i sur., 2013.). Navedene talijanske i ruske sorte nalaze se u pedigreima mnogih hrvatskih sorata (Dvojković, 2009.; Petrović, 2011.) kao posljedica oplemenjivačkog programa koji je uslijedio introdukcijom talijanskih, a kasnije i ruskih sorti, na naša područja (Borojević i Borojević, 2005.b). Zbog prethodno navedenog negativnog utjecaja *Rht-B1b* i *Rht-D1b* gena pri visokim temperaturama tijekom cvjetanja, *Rht8* gen favoriziran je u zemljama južne i jugoistočne Europe. Većina oplemenjivača tih područja selekcijom je odabirala gentipove s kombinacijom *Rht8* i *Ppd-D1* gena, zbog svojstva niže stabljike i ranozrelosti. Važnost ovih gena najviše je izražena kod hrvatske sorte Srpanjka kojoj rano klasanje i niska stabljika omogućuju visok prinos. Velika učestalost alela od 192 bp dobivena u ovom istraživanju slaže se s drugim istraživanjima. Alel od 192 bp identificiran je u 84,5% sorata bugarske pšenice (Ganeva i sur., 2005.), 78,3% srpskih sorata (Tošović-Marić i sur., 2008.), 77,5% ruskih sorata (Divashuk i sur., 2013.), te preko 90% ukrajinskih i čeških sorata (Chebotar i sur., 2001.; Šip i sur., 2011.), što dokazuje njegovu rasprostranjenost i u istočnoj Europi. Osim alela od 192 bp, kod dvije hrvatske sorte, U1 i Osječka 20, identificiran je alel od 165 bp, a kod sorte Nova Žitarka alel od 174 bp, što je potvrđeno istraživanjima koje su proveli Dvojković (2009.) i Petrović (2011.). Alel od 165 bp, podrijetlom iz japanske sorte Saitama 27, prevladava u oplemenjivačkom materijalu CIMMYT-a, dok alel od 174 bp iz japanske sorte Norin 10, koji je povezan s genom za

osjetljivost na fotoperiodizam (*Ppd1*), prevladava u francuskim, njemačkim te u sortama Ujedinjenog Kraljevstva (Worland i sur., 1998.; Zheleva i sur., 2006.). U sortama s alelima od 165 i 174 bp identificirani su i *Rht-B1b* i/ili *Rht-D1b* aleli pa se može zaključiti da se u njihovim pedigreima nalaze sorte podrijetlom sa CIMMYT-a.

Veliki broj autora (Korzun i sur., 1998; Worland i sur., 1998.; Worlan i sur., 2001.; Zheleva i sur., 2006.) smatra da alelna varijanta od 192 bp na *Rht8* genu u usporedbi sa 174 bp alelom smanjuje visinu stabljike za 7- 8 cm, dok ona od 165 bp povećava stabljiku za oko 3 cm. Kombinirani utjecaj *Rht8* i *Ppd-D1* gena smanjuje visinu stabljike i do 10 cm, povećava plodnost klasića i omogućuje ranije cvjetanje za osam dana (Gale i Youssefian, 1985.). Dobiveni rezultati varijabilnosti na *Xgwm261* lokusu uspoređeni su s visinama biljaka pšenice iz poljskog pokusa i prikazani grafikonom 4.



Grafikon 4. Distribucija alelnih varijanti *Xgwm261* lokusa i visina sorata pšenice

Visine sorata s alelima od 165 i 174 bp u skladu su s povećavanjem visine stabljike koje su opisali Worland i sur. (1998.). Zbog prisutnosti ovih alela, kao i divljeg alela *Rht-B1a*, sorte U1, Thatcher i Capelle Desprez imale su visinu preko 100 cm. S druge strane, znatno niža visina sorti Osječka 20, Nova Žitarka, Soissons i Norin 10 može se pripisati prisutnosti *Rht-B1b* i *Rht-D1b* alela. Prisutnost alela od 197 bp, kao i divljeg alela *Rht-B1a* koje su utvrdili i Knopf i sur. (2008.), objašnjava visinu sorte Altos (111 cm). Sorte pšenice u kojima je identificiran alel od 192 bp imale su visinu od 73 (Srpanjka) do 120 cm

(Chinese Spring). Ellis i sur. (2007.b) utvrdili su da alelna varijanta od 192 bp ne mora uvijek biti povezana s *Rht8* genom i smanjivanjem visine biljke što objašnjava dobivene rezultate. S obzirom na to, prisutnost alelne varijante od 192 bp na *Xgwm261* lokusu dijagnostična je za *Rht8* gen samo u sortama u čijem se pedigreu nalazi japanska sorta Akakomugi ili Strampellijeve pšenice.

Kod 19 od 30 sorata (63,3%) identificirana je kombinacija alela od 192 bp i *Rht-B1b* i/ili *Rht-D1b* alela za smanjivanje visine stabljike. Znatno manje učestalosti ovih gena zabilježili su Geneva i sur. (2005.), Zhang i sur. (2006.) i Tošović-Marić i sur. (2008.) u bugarskim (27%), kineskim (31,4%) te u srpskim (33%) i drugim stranim pšenicama.

S obzirom na moguću nepovezanost alela od 192 bp s *Rht8* genom, poteškoće prilikom ispitivanja varijabilnosti *Rht-B1b* i *Rht-D1b,* kao i visoke učestalosti gena u ovom istraživanju, potrebno je proširiti ispitivanje varijabilnosti ovih gena na veći broj sorata pšenice podrijetlom iz različitih zemalja te obaviti detaljne analize njihovih pedigrea. Potrebno je i daljnje razvijanje molekularnih markera pomoću kojih će se s većom sigurnošću moći identificirati spomenuti, ali i alternativni geni za smanjivanje visine pšenice. Kako bi se smanjio mogući utjecaj ekstremnih klimatskih uvjeta na rezultate, nužno je provesti i višegodišnje poljske pokuse s očitavanjem većeg broja agronomskih svojstava.

6. Zaključak

Istraživanje je provedeno u svrhu ispitivanja varijabilnosti alela na *Xgwm261* lokusu povezanim s *Rht8* genom, te *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusima pomoću SSR markera kod hrvatskih i stranih sorti te njihovog utjecaja na visinu biljke u poljskom pokusu tijekom vegetacijske godine 2013./2014.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. na *Xgwm261* lokusu identificirana su četiri različita alela od kojih je najzastupljeniji bio alel od 192 bp, prisutan u 22 sorte (73,3%), odnosno 17 (85%) hrvatskih sorti.

2. GA- neosjetljivi *Rht-B1b* i *Rht-D1b* aleli odgovorni za smanjivanje visine stabljike bili su zastupljeni kod 19 sorata (63,3%) odnosno 21 sorte (70%).

3. gotovo sve sorte pšenice imale su očekivane visine s obzirom na prisutnost određenih alela na *Xgwm261* lokusu, između 73,4 cm (Srpanjka) i 136,3 cm (U1), iako to nije bio slučaj kod prisutnosti različitih alela *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusa.

4. razlike u rezultatima varijabilnosti na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusu, kao i izmjerenim visinama, sugeriraju na moguću nespecifičnost mikrosatelitnih markera i ekstremne klimatske uvjete tijekom vegetacijske sezone.

5. kod 19 od 30 sorata (63,3%) identificirana je kombinacija alela od 192 bp i *Rht-B1b* i/ili *Rht-D1b* alela za smanjivanje visine stabljike.

7. Popis literature

1. Addisu, M., Snape, J.W., Simmonds, J.R., Gooding, M.J. (2009.): Reduced height (*Rht*) and photoperiod insensitivity (*Ppd*) allele associations with establishment and early growth of what in contrasting production systems. Euphytica, 166: 249-267.

2. Ahmad, M., Sorrells, M.E. (2002.): Distribution of microsatellite alleles linked to *Rht8* dwarfing gene in wheat. Euphytica, 123 (2): 235-240.

3. Bai, G., Das, M.K., Carver, B.F., Xu, X., Krenzer, E.G. (2004.): Covariation for Microsatellite Marker Alleles Associated with *Rht*8 and Coleoptile Length in Winter Wheat. Crop Science, 44: 1187–1194.

4. Bede, M. (1994.): Novi tredovi u oplemenjivanju pšenice. Sjemenarstvo, 11 (1-2): 5-13.

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

6. Borojević, K., Borojević, K. (2005.a): Historic role of the wheat variety Akakomugi in Southern and Central European wheat breeding programs. Breeding Science, 55: 253-256.

7. Borojević, K., Borojević, K. (2005.b): The Transfer and History of ‘‘Reduced Height Genes’’ (*Rht*) in Wheat from Japan to Europe. Journal of Heredity, 96 (4): 455–459.

8. Chebotar, S. V., Korzun, V. N., Sivolap, Yu. M. (2001.): Allele Distribution at Locus WMS261Marking the Dwarfing Gene Rht8in Common Wheat Cultivars of Southern Ukraine. Russian Journal of Genetics, 37 (8): 894-898.

9. Clayshulte, S.R., Haley , S.D., Byrne, P.F., Shan, X. (2007.): Trait Associations at the *Xgwm 261* and *Rht-B1* Loci in Two Winter Wheat Recombinant Inbred Line Populations. Crop Science, 47 (6): 2346- 2355.

10. Divashuk, M. G., Bespalova, L. A., Vasilyev, A. V., Fesenko, I. A., Puzyrnaya, O. Yu., Karlov, G. I. (2013.): Reduced height genes and their importance in winter wheat cultivars grown in southern Russia. Euphytica, 190: 137–144.

11. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987.): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19:11-15.

12. Dvojković, K. (2009.): Genetska raznolikost hrvatskih kultivara pšenice. Dokrorski rad. Poljoprivredni institut Osijek.

13. Dvojković, K., Šatović, Z. , Drezner, G., Somers, D.J., Lalić, A., Novoselović, D. , Horvat, D., Marić, S., Šarčević, H. (2010.): Allelic variability of Croatian wheat cultivars at the microsatellite locus *xgwm261*. Poljoprivreda, 16: 32- 37.

14. Ellis, M.H., Spielmeyer, W., Gale, K.R., Rebetzke, G.J., Richards, R.A. (2002.): "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 105: 1038–1042.

15. Ellis M.H., Rebetzke G.J., Chandler P.A., Bonnett D., Spielmeyer W., Richards R.A. (2004.): The effect of different height reducing genes on the early growth of wheat. Functional Plant Biology, 31(6): 583–589.

16. Ellis, M.H., Bonnett, D.G., Rebetzke, G.J. (2007.a): A 192bp allele at the Xgwm261 locus is not always associated with the Rht8 dwarfing gene in wheat (Triticum aestivum *L*.). Euphytica, 157:209–214.

17. Ellis, M.H., Bonnett, D.G., Rebetzke, G.J. (2007.b): Borlaug, Strampelli and the worldwide distribution of *Rht8*. Wheat Production in Stressed Environments, Developments in Plant Breeding, 12: 787-791.

18. Flintham, J. E., Börner, A., Worland, A. J., Gale, M. D. (1997.): Optimizing wheat grain yield effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. The Journal of Agricultural Science, 128(1): 11-25.

19. Gale, M.D., Marshall, G.A., Rao, M.V. (1981.): A classification of the Norin 10 and Tom Thumb dwarfing genes in British, Mexican, Indian and other hexaploid bread wheat varieties. Euphytica, 30: 355–61.

20. Gale, M.D., Youssefian, S. (1985.): Dwarfing genes in wheat. U: Russell, G. E. (ur.) *Progress in Plant Breeding*.Butterworths. London, 1–35.

21. Ganeva, G., Korzun, V., Landjeva,S. , Tsenov, N., Atanasova, M. (2005.): Identification, distribution and effects on agronomic traits of the semi-dwarfing *Rht* alleles in Bulgarian common wheat cultivars. Euphytica, 145: 305–315.

22. Grljušić, S. (2003.): Genetska varijabilnost kultivara crvene djeteline (*Trifolium pratense L.*) nakon selekcije u brdsko-planinskim uvjetima. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb

23. Guedira , M. , Brown-Guedira , G. , Van Sanford, D., Sneller, C. , Souza, E., Marshall, D. (2010.): Distribution of *Rht* Genes in Modern and Historic Winter Wheat Cultivars from the Eastern and Central USA. Crop Science, 50 (5): 1811- 1822.

24. Hedden, P. (2003.): The genes of the Green Revolution. Trends in Genetics, 19 (1): 5-9.

25. Kang, H.-Y. , Lin, L.-J., Song, Z.-J., Yuan, J.-Y., Zhong, M.-Y., Zhang, H.-Q., Fan, X., Sha, L.-N., Wang, Y., Xu, L.-L., Zeng, J., Zhou, Y.-H. (2012.): Identification, fine mapping and characterization of *Rht-dp*, a recessive wheat dwarfing (reduced height) gene derived from *Triticum polonicum*. Genes & Genomics, 34 (5): 509-515.

26. Knopf, C., Becker, H., Ebmeyer, E., Korzun, V. (2008.): Occurrence of Three Dwarfing *Rht* Genes in German Winter Wheat Varieties. Cereal Research Communications, 36(4): 553–560.

27. Kolev, S., Ganeva, G., Christov, N., Belchev, I., Kostov, K., Tsenov, N., Rachovska, G., Landgeva, S., Ivanov, M., Abu-Mhadi, N., Todorovska, E. (2010.): Allele variation in loci for adaptive response and plant height and its effect on grain yield in wheat. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 24 (2): 1807-1813.

28. Korzun, V., Röder, M. S., Worland, A. J., Börner, A. (1997.): Mapping of the dwarfing (*Rht12*) and vernilisation response (*Vrn1*) genes in wheat by using RFLP and microsatellite markers. Plant Breeding, 116: 227-232.

29. Korzun, V., Röder, M. S., Ganal, M. W., Worland, A. J., Law, C. N. (1998.): Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (Triticum aestivum L.). Theoretical and Applied Genetics, 96(8): 1104-1109.

30. Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R., Pandey, B.K. (2009.): Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology, Plant Omics Journal 2 (4): 141-162.

31. Li, P., Chen, J., Wu, P., Zhang, J., Chu, C., See, D., Brown-Guedira, G., Zemetra, R., Souza, E. (2011.): Quantitative Trait Loci Analysis for the Effect of *Rht-B1* Dwarfing

Gene on Coleoptile Length and Seedling Root Length and Number of Bread Wheat. Crop Science, 51: 2561- 2568.

32. Liang, D., Yang, F.P., He, Z.H., Yao, D.N., Xia, X.C. (2009.): Characterization of *Lr34/Yr18*, *Rht-B1b*, *Rht-D1b* genes in CIMMYT wheat cultivars and advanced lines using STS markers. Scientia Agricultura Sinica, 42 (1): 17-27.

33. Lin, X, Li, Y.,Lu, L., Zhang, C., Liao, J., Li, L.,Wu,Y. (2014.): Identification of wheat dwarfing genes *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht8* and their effects on plant height. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 20 (1): 80- 86.

34. Liu,Y., Liu, D., Zhang, H., Wang, J., Sun, J., Guo, X., Zhang, A. (2005.): Allelic variation, sequence determination and microsatellite screening at the *XGWM261* locus in Chinese hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties. Euphytica, 145 (1-2): 103-112.

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

36. McIntosh, R.A.,Yamazaki,Y., Dubcovsky, J., Rogers, W.J., Morris, C., Somers, D.J., Appels, R., Devos, K.M. (2012.): Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Dostupno na: [http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneSymbol.pdf]. Datum pristupa: 19.02.2014.

37. Petrović, S. (2011.): Genetska različitost germplazme ozime krušne pšenice (*Triticum aestivum* L. *ssp. vulgare*). Doktorski rad. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

38. Petrović, S., Marić, S., Čupić, T., Drezner, G., Karsai, I. (2012.): Distribution of allelic variants of hexaploidc wheat germplasm at *Xgwm*261 and *Ppd-D*1 locus. Poljoprivreda, 18 (2): 25-29.

39. Plaschke, J., Ganal, M.W., Röder, M.S. (1995.): Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics, 91: 1001-1007.

40. Rebetzke, G.J., Ellis, M.H., Bonnett, D.G. , Mickelson, B., Condon, A.G., Richards, R.A. (2012.): Height reduction and agronomic performance for selected gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Field Crops Research, 126: 87–96.

41. Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganal, M.W. (1998.): A Microsatellite Map of Wheat. Genetics, 149 (4): 2007-2023.

42. Salvi, S., Porfiri, O., Ceccarelli, S. (2013.): Nazareno Strampelli, the „Prophet“ of the green revolution. Journal of Agricultural Science, 151: 1-5.

43. Šíp, V., Chrpová, J., Žofajová, A., Pánková, K., Užík, M., Snape, J.W. (2010.): Effects of specific *Rht* and *Ppd* alleles on agronomic traits in winter wheat cultivars grown in middle Europe. Euphytica, 172 (2): 221-233.

44. Šip, V., Chrpova, J., Žofajova, A., Milec, Z., Mihalik, D., Pankova, K., Snape, J.W. (2011.): Evidence of selective changes in winter wheat in middle-European environments reflected by allelic diversity at loci affecting plant height and photoperiodic response. Journal of Agricultural Science, 149: 313-326.

45. Tošović-Marić, B., Kobiljski, B., Obreht, D., Vapa, Lj. (2008.): Evaluation of wheat *Rht* genes using molecular markers. Genetika, 40 (1): 31 – 38.

46. Worland, A. J., Korzun, V., Röder, M. S., Ganal, M. W., Law, C. N. (1998.): Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening. Theoretical and Applied Genetics, 96 (8): 1110-1120.

47. Worland, A. J., Sayers, E. J., Korzun, V. (2001.): Allelic Variation at the Dwarfing Gene *Rht8* Locus and Its Significance in International Breeding Programmes. Euphytica, 119: 155-159.

48. Yang, S., Liu, S. (2006.): Distribution and Genetic Analysis of Dwarfing Gene *Rht-D1b* in Chinese Bread Wheat Cultivars and Lines. Dostupno na: [http://www.shigen.nig.ac.jp/ewis/article/html/9/article.html]. Datum pristupa: 22.04.2014.

49. Zhang, X., Yang, S., Zhou, Y., He, Z., Xia, X. (2006.): Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1b* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers. Euphytica, 152 (1): 109-116.

50. Zheleva, D., Todorovska, E., Jacquemin, J.-M., Atanassov, A., Christov, N., Panayotov, I., Tsenov, N. (2006.): Allele distribution at microsatellite locus xgwm 261 marking the dwarfing gene Rht8 in hexaploid wheat from Bulgarian and Belgian gene

bank collections and its application in breeding programs. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 20 (2): 45-56.

Internet stranice:

1. http://faostat.fao.org/
2. http://maswheat.ucdavis.edu/
3. http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/
4. http://wheatpedigree.net/
5. http://wheatpedigree.net/gene/list
6. http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/

8. Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati varijabilnost *Rht* gena u 20 hrvatskih i 10 stranih ozimih pšenica pomoću mikrosatelitnog markera *gwm261* i specifičnih markera za *Rht-B1* i *Rht-D1* gene, te rezultate usporediti s visinom pšenice u poljskim pokusima. Identificirane su četiri različite alelne varijante na *Xgwm261* lokusu, od 165, 174, 192 i 197 bp. Najzastupljeniji je bio alel od 192 bp, u određenim slučajevima dijagnostičnan za *Rht8* gen, prisutan u 22 sorte (73,3%), odnosno 17 (85%) hrvatskih sorti. Ispitivanjem varijabilnosti na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusima, utvrđena je zastupljenost *Rht-B1b* i *Rht-D1b* alela kod 19 sorata (63,3%) odnosno 21 sorte (70%). Ovi aleli bili su prisutni u 80% hrvatskih sorata. Kombinaciju alela od 192 bp i *Rht-B1b* i/ili *Rht-D1b* alela imalo je 63,3% sorata. Gotovo sve sorte pšenice imale su očekivane visine s obzirom na prisutnost određenih alela na *Xgwm261* lokusu, između 73,4 cm (Srpanjka) i 136,3 cm (U1), iako to nije bio slučaj kod prisutnosti različitih alela *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusa.

9. Summary

The aim of this study was to determine the variability of *Rht* genes in 20 Croatian and 10 foreign winter wheat varieties using microsatellite marker *gwm261* and specific markers for *Rht-B1* and *Rht-D1* genes, and to compare the results with wheat heights obtained from field trial. Four different allels were determined on *Xgwm261* locus, 165, 174, 192 i 197 bp. 192 bp allel, in certain cases diagnostic for *Rht8* gene, was predominant in 22 varieties (73.3%) and 17 Croatian varieties (85%), respectively. Analysis of variability on *Rht-B1* and *Rht-D1* loci showed presence of *Rht-B1b* and *Rht-D1b* allels in 19 varieties (63.3%) and 21 varieties (70%), respectively. These allels were present in 80% of Croatian wheat varieties. Combination of *Xgwm261*- 192 bp allel, and one or both *Rht-B1b*, *Rht-D1b* allel was present in 63,3% varieties. Wheat height varied from 73.4 cm (Srpanjka) to 136.3 cm (U1), and in most cases was as expected considering allel distribution on *Xgwm261* locus, which was not the case for allel distribution on *Rht-B1* and *Rht-D1* loci.

10. Popis tablica

Tablica 1. Lista *Rht* gena, lokusa i alelnih varijanti

Tablica 2a. Godina priznavanja, podrijetlo i pedigre hrvatskih sorata ozime pšenice

Tablica 2b. Godina priznavanja, podrijetlo i pedigre stranih sorata pšenice

Tablica 3. Koncentracija DNA i PCR razrjeđenje uzoraka

Tablica 4. Svojstva para početnica mikrosatelitnog markera *gwm261*

Tablica 5. Koncentracije i sastav reakcijske smjese za PCR amplifikaciju *gwm261* početnica

Tablica 6. Svojstva parova početnica specifičnih mikrosatelitnih markera

Tablica 7. Koncentracije i sastav reakcijske smjese za PCR amplifikaciju specifičnih početnica

Tablica 8. Očekivani produkti PCR reakcije za *Rht-B1* i *Rht-D1* specifične početnice

Tablica 9. Razrjeđivanje oligonukleotidnih početnica

Tablica 10. Varijabilnost na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusima 30 sorata pšenice

Tablica 11. Alelna varijabilnost na lokusu *Xgwm261* kod 20 hrvatskih i 10 stranih sorata pšenice

11. Popis slika

Slika 1. Poljski pokus tijekom nicanja pšenice (foto original; I. Ravlić)

Slika 2. Poljski pokus u punoj zriobi pšenice (foto original; I. Ravlić)

Slika 3. Uzorci na stalku za mućkanje (foto original; I. Ravlić)

Slika 4. Centrifugiranje uzoraka (foto original; I. Ravlić)

Slika 5. Odvajanje tekuće od krute faze (foto original; I. Ravlić)

Slika 6. Vidljiva DNA nakon dodavanja izopropanola (foto original; I. Ravlić)

Slika 7. Kvaliteta izolirane DNA u usporedbi s lambdom-DNA (foto original; I. Ravlić)

Slika 8. Kvaliteta izolirane DNA u usporedbi s lambdom-DNA (foto original; I. Ravlić)

Slika 9. Elektroforeza produkata PCR reakcije (foto original; I.Ravlić)

Slika 10. G:Box uređaj za snimanje gela nakon elektroforeze

Slika 11. Identifikacija *Rht-B1b* alela kod hrvatskih sorata pšenice (foto original; I. Ravlić)

Slika 12. Identifikacija alela *Rht-D1* lokusa kod hrvatskih sorata pšenice (foto original; I. Ravlić)

Slika 13. Alelna varijabilnost na lokusu *Xgwm261* kod hrvatskih i stranih sorata pšenica (foto original; I. Ravlić)

12. Popis grafikona

Grafikon 1. Klima dijagram za područje Osijeka tijekom vegetacijske godine 2013./2014. i višegodišnji prosjek (1981.-2013.)

Grafikon 2. Prosječna visina sorata pšenice u poljskom pokusu

Grafikon 3. Distribucija alelnih varijanti *Rht-B1* i *Rht-D1* gena i visina sorata pšenice

Grafikon 4. Distribucija alelnih varijanti *Xgwm261* lokusa i visina sorata pšenice

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Varijabilnost *Rht* gena hrvatskih sorata ozime pšenice

Ivana Ravlić

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi varijabilnost *Rht* gena u 20 hrvatskih i 10 stranih ozimih pšenica pomoću mikrosatelitnog markera *gwm261* i specifičnih markera za *Rht-B1* i *Rht-D1* gene, te rezultate usporediti s visinom pšenice u poljskim pokusima. Identificirane su četiri različite alelne varijante na *Xgwm261* lokusu, od 165, 174, 192 i 197 bp. Najzastupljeniji je bio alel od 192 bp, u određenim slučajevima dijagnostičnan za *Rht8* gen, prisutan u 22 sorte (73,3%), odnosno 17 (85%) hrvatskih sorti. Ispitivanjem varijabilnosti na *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusima, utvrđena je zastupljenost *Rht-B1b* i *Rht-D1b* alela kod 19 sorata (63,3%) odnosno 21 sorte (70%). Ovi aleli bili su prisutni u 80% hrvatskih sorata. Kombinaciju alela od 192 bp i *Rht-B1b* i/ili *Rht-D1b* alela imalo je 63,3% sorata. Gotovo sve sorte pšenice imale su očekivane visine s obzirom na prisutnost određenih alela na *Xgwm261* lokusu, između 73,4 cm (Srpanjka) i 136,3 cm (U1), iako to nije bio slučaj kod prisutnosti različitih alela *Rht-B1* i *Rht-D1* lokusa.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: prof. dr. sc. Sonja Marić
Broj stranica: 50
Broj grafikona i slika: 17
Broj tablica: 11
Broj literaturnih navoda: 50
Broj priloga:
Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: pšenica, mikrosatelitni markeri, *Rht* geni, visina
Datum obrane:
Stručno povjerenstvo za obranu:
1. prof. dr. sc. Vlado Guberac, predsjednik
2. prof. dr. sc. Sonja Marić, mentor
3. doc. dr. sc. Sonja Petrović, 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 science

Variability of *Rht* genes in Croatian winter wheats

Ivana Ravlić

Abstract:

The aim of this study was to determine the variability of *Rht* genes in 20 Croatian and 10 foreign winter wheat varieties using microsatellite marker *gwm261* and specific markers for *Rht-B1* and *Rht-D1* genes, and to compare the results with wheat heights obtained from field trial. Four different allels were determined on *Xgwm261* locus, 165, 174, 192 i 197 bp. 192 bp allel, in certain cases diagnostic for *Rht8* gene, was predominant in 22 varieties (73.3%) and 17 Croatian varieties (85%), respectively. Analysis of variability on *Rht-B1* and *Rht-D1* loci showed presence of *Rht-B1b* and *Rht-D1b* allels in 19 varieties (63.3%) and 21 varieties (70%), respectively. These allels were present in 80% of Croatian wheat varieties. Combination of *Xgwm261*- 192 bp allel, and one or both *Rht-B1b*, *Rht-D1b* allel was present in 63.3% varieties. Wheat height varied from 73.4 cm (Srpanjka) to 136.3 cm (U1), and in most cases was as expected considering allel distribution on *Xgwm261* locus, which was not the case for allel distribution on *Rht-B1* and *Rht-D1* loci.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: prof. dr. sc. Sonja Marić
Number of pages: 50
Number of figures: 17
Number of tables: 11
Number of references: 50
Number of appendices:
Original in: Croatian
Key words: wheat, microsatellite markers, *Rht* genes, height
Thesis defended on date:
Reviewers:
1. prof. dr. sc. Vlado Guberac, chairman
2. prof. dr. sc. Sonja Marić, mentor
3. doc. dr. sc. Sonja Petrović, member

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