

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Tajana Platz, apsolvant

Diplomski studij: Bilinogojstvo

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

**VARIJABILNOST *Ppd* GENA HRVATSKIH SORATA OZIME PŠENICE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2014.**

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Tajana Platz, apsolvant

Diplomski studij: Bilinogojstvo

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

**VARIJABILNOST *Ppd* GENA HRVATSKIH SORATA OZIME PŠENICE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2014.**

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Tajana Platz, apsolvant

Diplomski studij: Bilinogojstvo

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

**VARIJABILNOST *Ppd* GENA HRVATSKIH SORATA OZIME PŠENICE**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

prof. dr. sc. Sonja Marić, predsjednik

doc. dr. sc. Sonja Petrović, mentor

prof. dr. sc. Vlado Guberac, član

**Osijek, 2014.**

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	1
1.1. Cilj istraživanja	2
<b>2. Pregled literature</b>	3
2.1. <i>Ppd</i> geni u oplemenjivanju pšenice	3
2.2. Istraživanja varijabilnosti <i>Ppd</i> gena pomoću molekularnih markera	9
<b>3. Materijal i metode</b>	
3.1. Biljni materijal	12
3.2. Metode rada	
3.2.1. Poljski pokus i klimatski uvjeti	13
3.2.2. Laboratorijski pokus	15
3.2.2.1. Uzgoj klijanaca i izolacija genomske DNA	15
3.2.2.2. Metoda mikrosatelitnih markera	20
3.2.2.3. Elektroforeza	22
3.2.3. Očitavanje rezultata i obrada podataka	24
<b>4. Rezultati</b>	
4.1. Varijabilnost datuma klasanja sorata pšenice u poljskom pokusu	25
4.2. Ispitivanje varijabilnosti na <i>Ppd-D1</i> lokusu	26
<b>5. Rasprava</b>	
5.1. Varijabilnost na na <i>Ppd-D1</i> lokusu i datuma klasanja	28
<b>6. Zaključak</b>	32
<b>7. Popis literature</b>	33
<b>8. Sažetak</b>	37
<b>9. Summary</b>	38
<b>11. Popis tablica</b>	39
<b>12. Popis slika</b>	40
<b>13. Popis grafikona</b>	41
<b>14. Temeljna dokumentacijska kartica</b>	42
<b>15. Basic documentation card</b>	43

## 1. Uvod

Pšenica (*Triticum aestivum* L. *spp. vulgare*) je, uz rižu i kukuruz, jedan od najznačajnijih ratarskih usjeva te je njome zasijano blizu jedne četvrtine svjetske obradive površine. Prema podacima iz 2012. godine pšenica se uzgajala na 215 489 485 ha godišnje. 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.). Najvažniji proizvod dobiven iz pšenice je kruh kojim se hrani oko 70 % svjetske populacije. Osim za proizvodnju kruha, koristi se i za proizvodnju 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.). Sposobnost prilagodbe pšenice različitim klimatskim uvjetima i različitim tlima rezultirala je razvojem velikog broja sorata i kultivara, što omogućuje njezin uzgoj u gotovo cijelom svijetu.

Povećanjem broja stanovnika povećala se potreba za hranom, a time i bržim i efikasnijim stvaranjem novih poboljšanih kultivara višeg prinosa. Glavni cilj oplemenjivanja pšenice već dugi niz godina je razvoj visoko produktivnih sorata pšenice koje imaju nisku stabljiku i visoku otpornost na polijeganje, a koje su u isto vrijeme i rano dozrijevaju. Svojstvo ranozrelosti važno je zbog izbjegavanja razdoblja suše i visokih temperatura tijekom faze nalijeivanja zrna. Nedostatak vode i ekstremne temperature uzrokuju prekid nalijeivanja zrna pri čemu ono ostaje šturo i sitno, a prinos je manji.

Kod pšenice, fotoperiodizam je određen djelovanjem tri *Ppd* gena: *Ppd-A1*, *Ppd-B1* i *Ppd-D1* koji su smješteni na homolognim kromosomima 2A, 2B i 2D. Dominantne alelne varijante *Ppd-D1a*, *Ppd-B1a* i *Ppd-A1a* odgovorne su za neosjetljivost biljke na fotoperiod, a najjači utjecaj ima alel *Ppd-D1a* koji je ujedno i najrašireniji u današnjem oplemenjivanju pšenice (Laurie i sur., 1995.)

Kako bi se geni odgovorni za reakciju biljke na duljinu dana mogli primjenjivati u oplemenjivanju, potrebno ih je identificirati i mapirati na genetskoj mapi pšenice. To se može postići korištenjem mikrosatelitnih markera koji su usko vezani za gen svojstva od interesa. Primjenu molekularnih markera u oplemenjivanju bilja nazivamo markerima potpomognutom selekcijom (Collard, Mackill, 2008.).

Mikrosatelitni markeri najučinkovitiji su za ispitivanje genetske različitosti (Plaschke i sur., 1995.), te za identifikaciju i mapiranje agronomski važnih gena (Korzun i sur., 1997.) zbog visokog stupnja polimorfizma i pravilne raspoređenosti po genomu pšenice.

U svrhu ispitivanja varijabilnosti *Ppd* gena i njihovih lokusa kreirane su specifične mikrosatelitne početnice za *Ppd-D1* lokus (Beales i sur., 2007.), *Ppd-B1* lokus (Seki i sur., 2011.) i *Ppd-A1* lokus (Seki i sur., 2013.).

### **1. 1. Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati genetsku varijabilnost *Ppd-D1* lokusa 20 hrvatskih sorata ozime pšenice pomoću mikrosatelitnih markera te ih usporediti s datumom klasanja pšenice u poljskom pokusu.

## 2. Pregled literature

### 2. 1. *Ppd* geni u oplemenjivanju pšenice

Fotoperiodizam je fiziološki odgovor biljke na dužinu osvjetljenosti, odnosno dužinu dana. Reakcija biljaka na fotoperiod uključuje sposobnost biljke da razlikuje svjetlo od tame, da „mjeri vrijeme“ te da reagira na promjene osvjetljenja. Period trajanja u kojem su biljke izložene svjetlu tijekom 24 sata zove se fotoperiod. Ovo je najpouzdaniji ekološki signal koji informira biljku o sezoni, i kao takav u mnogim biljnim vrstama ima važnu ulogu u regulaciji početka cvjetanja, to jest prijelazu iz vegetativne u generativnu fazu.. Obzirom na zahtjeve za dužinom dana i noći razlikujemo a) biljke koje su osjetljive na fotoperiod i zahtijevaju specifičan režim osvjetljenja da bi mogle prijeći iz generativne u vegetativnu fazu; te b) biljke koje su neutralne to jest neosjetljive na fotoperiod i cvjetaju nakon određene faze ontogeneze, bez obzira na dužinu dana. Biljke osjetljive na fotoperiod dijele se na a) biljke kratkog dana, b) biljke dugog dana, c) biljke dugo-kratkog dana i d) biljke kratkog-dugog dana (Kamran i sur., 2013.).

Geni povezani s fotoperiodizmom u pšenici (a i ječmu) nazivaju se *Ppd*. Izvor *Ppd* gena je stara japanska sorta pšenice Akakomugi. Glavna obilježja ove sorte su niska stabljika (zbog posjedovanja *Rht8* gena) i rano sazrijevanje (zbog posjedovanja *Ppd-D1* gena). Početkom 20.st. talijanski oplemenjivač Nazareno Strampelli, u želji za povećanjem varijabilnosti gemplazme talijanskog sortimenta pšenice, je križao tadašnje tradicionalne talijanske sorte sa sortom Akakomugi. Rezultat križanja je bilo potomstvo koje se odlikovalo niskom stabljikom, a vezano s tim i povećanom otpornošću na polijeganje, te koje je sazrijevalo 1-3 tjedna ranije i na taj način izbjeglo razdoblje suše tijekom faze nalijevanja zrna (Salvi i sur., 2013.).

Linije proizašle iz križanja bile su Mentana, Ardito, Villa Glori, a kasnije i San Pastore koje su korištene kao roditelji u oplemenjivačkim programima mnogih zemalja. Tako je na primjer Ardito poslužio kao roditelj u argentinskim, a Mentana u meksičkim programima oplemenjivanja. Razvojem ruske sorte Bezostaja 1 koja u svom pedigreu ima sortu Akakomugi, a kasnije i sorti Avrora i Kavkaz, geni *Rht8* i *Ppd-D1* proširili su se i u pšenice Istočne Europe. Sorte San Pastore i Bezostaja 1 bile su temelj oplemenjivačkog programa

bivše Jugoslavije (Borojević i Borojević, 2005), a vezano s tim i našeg, hrvatskog (Martinčić i Kozumplik, 1996.).

Temeljni ciljevi oplemenjivačkog programa pšenice u Hrvatskoj su stvaranje sorte pšenice koja se odlikuje visokim prinosom i kvalitetom zrna, niskom stabljikom, otpornošću na polijeganje, zimu i najznačajnije bolesti pšenice te koja je u isto vrijeme ranozrela. Dva najznačajnija trenutka u oplemenjivanju pšenice u Hrvatskoj bili su stvaranje Osječke šišulje (također zvane U1) i početak introdukcije talijanskih i ruskih kultivara. Osječka šišulja stvorena je 1936. na Poljoprivrednom institutu u Osijeku križanjem talijanskog kultivara Carlotta Strampelli s kanadskim kultivarom Marquis, a odlikovala se nizom pozitivnih svojstava, između ostalog i ranozrelošću. Drugi važan trenutak u oplemenjivanju u Hrvatskoj zbilo se krajem 50-ih godina prošlog stoljeća početkom introdukcije talijanskih i ruskih kultivara u domaću germplazmu pšenice. Od talijanskih kultivara isticali su se San Pastore, Libellula i Leonardo čije su glavne značajke visok i stabilan prinos, ranozrelost i otpornost na polijeganje. Ove sorte u svom pedigreu imaju staru japansku sortu Akakomugi koja je nositelj *Ppd-D1a* alela (Salvi i sur., 2013.). Najznačajniji introducirani ruski kultivari su Bezostaja 1, Kavkaz i Aurora. Osobine ovih kultivara su otpornost na zimu i visoka kvaliteta zrna. (Martinčić i Kozumplik, 1996.). Sorte koje su nastale kao rezultat ovakvog oplemenjivačkog programa se odlikuju ranozrelošću, a najznačajnije su Dubrava (1968.), Slavonka (1970.), Tena (1973.), Zlatna Dolina (1974.), Osječka crvenka (1976.) i Osječka 20 (1980.). Ove sorte kasnije su poslužile kao osnova za stvaranje novih kultivara ozime pšenice visokog rodnog potencijala i kvalitete koje su se ujedno odlikovale i ranozrelošću. Najznačajnije su Slavonija, Žitakra, Srpanjka, Ana, Demetra i dr. (Bede, 1992.).

Nedavna istraživanja su pokazala da je *Ppd-D1* gen porijeklom iz sorte Akakomugi još uvijek vrlo raširen u meksičkom sortimentu krušne pšenice (Guo i sur., 2010.).

Razvoj visoko produktivnih sorata pšenice koje imaju nisku stabljiku i visoku otpornost na polijeganje te koje su u isto vrijeme i ranozrele jedan je od glavnih oplemenjivačkih ciljeva u mnogim zemljama već dugi niz godina. Geni koji utječu na adaptabilnost pšenice određenim klimatskim uvjetima imaju veliki utjecaj na ekspresiju gena za prinos zrna. Veliku važnost u povećanju adaptabilnosti imaju geni za fotoperiodizam, *Ppd* geni, posebice alel za neosjetljivost na fotoperiodizam, *Ppd-D1a* (Šip i sur., 2010.). Ova alelna varijanta se vrlo često nalazi zajedno s *Rht8* genom, genom za nižu stabljiku, a ovakva kombinacija tzv. *linkage block* omogućuje simultano oplemenjivanje na ranozrelost i nižu stabljiku (Pestsova i



Roder, 2002). Povezanost gena *Rht8* i *Ppd-D1* dokazana je krajem 20.st. Analizom pomoću mikrosatelita ustanovljeno je da se ova dva gena nalaze na 2D kromosomu te je tako potvrđena njihova uska povezanost (Borojević i Borojević, 2005). Kombinacija *Ppd-D1a/Rht8* pronađena je talijanskoj, ruskoj i jugoslavenskoj germplazmi pšenice, ali nije pronađena u germplazmi zapadne Europe. Razlog tome je puknuće veze između *Ppd-D1a* i *Rht8* kojeg je izazvao nedostatak adaptivne prednosti *Ppd-D1a/Rht8* sorata (Worland i sur., 1998.).

Pšenica pripada skupini biljaka dugog dana čije je cvjetanje ubrzano dužinom dana. Unatoč tom ograničenju, pšenica je jedan od najadaptabilnijih usjeva obzirom na različite klimatske uvjete i tlo, a postojanje ozime i jare forme omogućuje uzgoj u gotovo cijelom svijetu. Uzgojno područje ozime pšenice je blaga i umjereno kontinentalna klima, a raspon uzgoja na sjevernoj hemisferi je od 16-60° N. Jara pšenica se uzgaja u manje povoljnim uvjetima, ima kraću vegetaciju, malo je zastupljena u optimalnom uzgojnom području i bolje podnosi sušu te visoke temperature. Krajnja sjeverna granica uzgoja 67° N a na južnoj hemisferi uzgaja se do krajnjih granica Australije, Afrike i južne Amerike (Kovačević i Rastija, 2009., Gagro 1997.). Sorte neosjetljive na fotoperiod uzgajaju se u područjima bliže ekvatoru gdje kraći dan može produžiti vegetativnu fazu razvoja pšenice osjetljive na fotoperiod. Na višim nadmorskim visinama uspijevaju i komercijalno se uzgajaju i osjetljive i neosjetljive sorte (Dyck i sur., 2004.). Općenito, neosjetljivije sorte ranije klasaju i sazrijevaju u odnosu na osjetljive (Worland, 1996.).

Adaptabilnost pšenice na različite klimatske prilike najviše ovisi od vremenu cvjetanja budući da jutarnji mraz može oštetiti nježne cvjetove i reproduktivne organe unutar njih, a visoke temperature mogu uzrokovati smanjenje fertilitnosti. Pšenica ima sposobnost cvatnje kroz duži vremenski period što joj je omogućilo prilagodbu širokom spektru različitih geografskih područja i klimatskih prilika. Genetski gledano, ta adaptabilnost rezultat je djelovanja tri glavne grupe gena: gena za odgovor na vernalizaciju (*Vrn*), odgovor na fotoperiod (*Ppd*) te gena koji utječu na samu ranozrelost (*Eps*) (Kamran i sur., 2013., White i sur., 2008.).

Široki areal rasprostranjenosti ukazuje na postojanje određene varijabilnost u odgovoru na dužinu dana (Guo i sur., 2010.). Kod pšenice, fotoperiodizam je određen djelovanjem tri *Ppd* gena: *Ppd-A1*, *Ppd-B1* i *Ppd-D1* koji su smješteni na homolognim kromosomima 2A, 2B i 2D (Laurie i sur., 1995). Lista *Ppd* gena, njihovih lokusa i alelnih varijanti dana je u Tablici 1.

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

Gen	Lokus	Alelna varijanta (duljina fragmenta)
<i>Ppd-A1</i>	2AL <sup>1</sup>	<i>Ppd-A1a</i> (338bp)
		<i>Ppd-A1b</i> (299bp)
<i>Ppd-B1</i>	2BS	<i>Ppd-B1a</i> (1600bp)
		<i>Ppd-B1b</i> (1292bp)
<i>Ppd-D1</i>	2DS	<i>Ppd-D1a</i> (288bp)
		<i>Ppd-D1b</i> (414bp)

Stupnjevi jakosti neosjetljivosti na fotoperiod su različiti, ali dosadašnja istraživanja su potvrdila da najjači utjecaj na neosjetljivosti na fotoperiod ima alel *Ppd-D1a*, a slijede ga *Ppd-B1a* i *Ppd-A1a* (Worland, 1996.). Dominantne alelne varijante *Ppd-D1a* i *Ppd-B1a* odgovorne su za neosjetljivost biljke na fotoperiod, a sorte koji ih imaju cvjetaju i u uvjetima kratkog i u uvjetima dugog dana. Varijante *Ppd-D1b* i *Ppd-B1b* su recesivne i uzrokuju osjetljivost na dužinu dana što je rezultiralo sortama koji u neodgovarajućim uvjetima dužine osvjetljenosti klasaju kasnije ili ne klasaju uopće. Najčešći izvor neosjetljivosti je dominantni alel *Ppd-D1a* (Guo i sur., 2009., Lanning i sur., 2012.).

Geni za fotoperiod imaju plejotropan<sup>2</sup> učinak (Kereša i sur., 2008.). Worland (1996.) navodi da je dominantni alel *Ppd-D1a* u uskoj vezi sa svojstvom prinosa. U suhim i toplim klimatskim uvjetima kakvi prevladavaju u južnoj Europi, sorte koji imaju alel *Ppd-D1a* daju i do 35% veće prinose u odnosu na one s recesivnim alelom. U hladnijim i vlažnijim klimatskim uvjetima razlike u prinosu su nešto manje, dominantni alel je povezan s 15% višim prinosom.

U zemljama sjeverne Europe, gdje prevladavaju hladniji i vlažniji klimatski uvjeti, zbog nižih ljetnih temperatura i obilnijih oborina tijekom ljetnih mjeseci bolje uspjevaju kultivari produženog vegetativnog razvoja koji kasnije cvatu. Kod ovih kultivara determinaran je *Ppd-*

<sup>1</sup> S (short)/L (long)- kratki/dugi krak kromosoma

<sup>2</sup> osobina nekog gena da određuje veći broj svojstava

D1b alel koji je povezan s osjetljivošću na fotoperiodizam, a prevladava u sortama Ujedinjenog Kraljevstva, Francuske i Njemačke u čije oplemenjivačke programe je unešen preko japanske sorte Norin 10 (Worland i sur., 1998.). Šip i sur. (2009.) navode da bi *Ppd-D1b* alel mogao biti ključ za daljnju adaptiranost pšenice provjenjivim klimatskim uvjetima.

Foulkes i sur. (2004.) navode da u klimatskim uvjetima Velike Britanije nije pronađena pozitivna korelacija između *Ppd-D1a* alela i povećanja prinosa, ali je ovaj alel povezan s povećanim razvojem zelene mase u ranijim razvojnim stadijima biljke te s efikasnijim stvaranjem suhe tvari sjemena, što je povezano s poboljšanjem žetvenog indeksa.

Lanning i sur. (2012.) istraživali su međuzavisnost datuma sjetve, klasanja i fotoperiodizma. Tri seta linija jare pšenice koje su se razlikovale u svojstvu fotoperiodizma uzgajane su od 2009. do 2012. na 15 različitih lokacija na zapadnom području Sjedinjenih Američkih Država. Sjetva je obavljena na tri različita datuma. Prva je obavljena u preporučeno vrijeme, a ostale dvije svaka u razmaku od dva tjedna. Početak klasanja je utvrđen kada je 50% klasova izašlo iz rukavca gornjeg lista. Obzirom na datum sjetve, rezultati su pokazali da su linije koje su imale gen za osjetljivost na fotoperiodizam klasale kasnije dva do tri dana kasnije u odnosu na linije s genom za neosjetljivost na fotoperiodizam. Veći prinos su dale linije osjetljive na fotoperiod. Lanning i sur. smatraju da su za uzgoj na ovom području superiornije linije osjetljive na fotoperiod, a razlog tome su sve više proljetne temperature u vrijeme klijanja pšenice.

Različite studije pokazuju utjecaj *Ppd* gena na početak cvjetanja. Foulkes i sur. (2004.) navode skraćenje vremena do cvjetanja do 9 do 12 dana, a Worland (1996.) spominje skraćenje od 4 do 8 dana. Kereša i sur. (2008.) navode da dominantna alelna varijanta *Ppd-A1* gena, neosjetljiva na fotoperiod, kod ozimih pšenica izloženih kratkom danu može ubrzati cvatnju za 7 dana u odnosu na sorte s recesivnom alelnom formom istog gena.

Pleiotropan učinak *Ppd* gena vidljiv je i na raznim agronomskim svojstvima. Dominantni *Ppd* geni su povezani, kroz povezanost s *Rht8* genom, sa skraćenjem stabljike (Worland, 1996., (Guo i sur., 2009.). Oni utječu na broj razvijenih listova tijekom vegetacije (Miralles i Richard, 2000.) kao i na formiranje bočnih izdanaka (Dyck i sur., 2004.) te na veličinu lisne površine (Foulkes i sur., 2004.). Također, utječu i na formirani broj klasića po klasu (Snape i sur., 2001.) i masu 1000 zrna (Guo i sur., 2009.) *Ppd* geni mogu djelovati i negativno na

broja klasića u klasu, to jest uzrokuju njihovu redukciju, što u kombinaciji sa skraćenim razdobljem vegetacije rezultira smanjenjem uroda i do 5% (Kereša i sur., 2008.).

Suša, odnosno nedostatak vlage u tlu je jedan od važnih abiotskih stresova koji uzrokuje velike gubitke u proizvodnji usjeva. Kod pšenice ti gubici mogu iznositi 14-50%. Selekcija sorata tolerantnih na sušu je zbog toga vrlo važan cilj u oplemenjivanju pšenice. Tolerantnost na sušu kompleksno je svojstvo koje ima nekoliko mehanizama djelovanja. Jedan od tih mehanizama je i izbjegavanje suše, a ono se postiže ranim dozrijevanjem. Ranozrelost uključuje pravovremenu cvatnju koja je, između ostalog, određena i *Ppd* genima odgovornim za fotoperiodizam (Kereša i sur., 2008.).

Uspoređujući učinke alela *Ppd-D1a* i *Ppd-D1b*, Foulkes i sur. (2004.) su ustanovili da *Ppd-D1b* sorte zbog produženog razdoblja do cvatnje imaju bolje razvijen korijenski sustav što utječe na bolju sposobnost usvajanja vode iz tla tijekom vegetacije i pomaže biljci da lakše preživi sušna razdoblja.

Osim nedostatka vlage, i visoke temperature tijekom ljetnih mjeseci mogu imati negativan utjecaj na prinos. Naime, visoke temperature uzrokuju prekid nalijevanja zrna pri čemu ono ostaje šturo i sitno, a prinos je time manji. Prekid nalijevanja zrna može se izbjeći uzgojem sorti koje su neosjetljive na fotoperiod. Budući da takve sorte cvjetaju neovisno o duljini dana, može se očekivati da će s ranijim terminom sjetve biljka ranije početi cvjetati, a time će i nalijevanja zrna završiti prije početka razdoblja visokih temperatura (Lanning i sur., 2012.).

Nadalje, Addisu i sur. (2010.) su demonstrirali kroz niz eksperimenata da je alel *Ppd-D1a* u uzgojnim uvjetima zapadne Europe imao korisno djelovanje na porast u ranim fazama razvoja biljke, svojstvo koje je izuzetno korisno u organskoj poljoprivrednoj proizvodnji.

## 2. Istraživanja varijabilnosti *Ppd* gena pomoću molekularnih markera

U nastavku poglavlja dan je kratki pregled najznačajnijih novijih istraživanja varijabilnosti *Ppd* gena, pomoću mikrosatelitnih markera za identifikaciju *Ppd-A1*, *Ppd-B1* i *Ppd-D1* gena.

Börner i sur. (1998.) su koristili RFLP<sup>3</sup> markere za usporedbu homolognih gena koji kontroliraju osjetljivost na giberelinsku kiselinu te odgovor na vernalizaciju i fotoperiod u pšenici, ječmu i riži. Utvrdili su da je 2D kromosom pšenice kolinearan sa 2HS kromosomom ječma na kojem se nalazi lokus za *Ppd-H1*, gen koji regulira odgovor na fotoperiod.

Beales i sur. (2007.) bavili su se detaljnijim uspoređivanjem veze između kolinearnih kromosoma ječma i heksaploidne pšenice, *Ppd-H1* i *Ppd-D1*, koji kontroliraju reakciju biljke na duljinu dana. U istraživanju su korištene sorte pšenice za koje je od prije poznato da su nosioci *Ppd* alela. Beales i sur. (2007.) su kreirali specifične mikrosatelitne početnice, nazvane *Ppd-D1\_F1*, *Ppd-D1\_R1* i *Ppd-D1\_R2* pomoću kojih su detektirali alelne varijante na *Ppd-D1* lokusu. Početnice *Ppd-D1\_F1* i *Ppd-D1\_R1* dale su PCR fragmente od 414 bp, dok su PCR fragmenti od 288 bp rezultat para početnica *Ppd-D1\_F1* i *Ppd-D1\_R2*. Razlika u broju parova baza ukazuje na deleciju od 2089 bp na kratkom kraku 2D kromosoma pšenice. Ova mutacija odgovorna je za promjenu osjetljivosti u neosjetljivost na fotoperiod kod pšenice, a alel koji ju ima nazvan je *Ppd-D1a*.

Guo i sur. (2009.) smatraju da široka adaptabilnost pšenice nije rezultat djelovanja samo dvaju alelnih varijanti (*a* i *b*) *Ppd-A1*, *Ppd-B1* i *Ppd-D1* gena nego da je njihov učinak određen djelovanjem grupe alela. Oni su proučavali distribuciju i učinak haplotipova<sup>4</sup> *Ppd-D1* gena u 492 sorte pšenice s različitih prostora uzgoja i 55 sorti diploidne trave *Aegilops tauschii*. Ova trava uključena je u istraživanje jer je prije više od 8000 godina njezinim spontanom križanjem s tetraploidnim *Triticum turgidum* nastala heksaploidna pšenica te je upravo ona donor genoma D (Jia, 2013.). U svom istraživanju, Guo i sur., su pomoću PCR markera identificirali šest haplotipova *Ppd-D1* gena i tako potvrdili hipotezu da postoji više od dvije alelne varijante ovog gena. Haplotipove su označili brojevima I-VI. Tipove II, V i VI smatraju "starim" tipovima dok su tipovi I, III i IV nastali iz tipa II kao rezultat adaptacije različitim klimatskim uvjetima uzgoja. Haplotip I imao je najveću učestalost pojave u ranozrelim sortama. Isti haplotip je pronađen i u sorti Akakomugi.

<sup>3</sup> Restriction fragment length polymorphism

<sup>4</sup> segment DNK s pripadajućim genima na jednom kromosomu koji se nasljeđuje u „paketu“, to jest koji nema mogućnosti rekombinacije zbog blizine gena

Yang i sur. (2009.) su se bavili utvrđivanjem učestalosti alela *Ppd-D1a* i *Ppd-D1b* u sortama pšenice iz kineskog sortimenta. Studija je provedena na 926 kultiviranih sorata pšenice iz devet različitih uzgojnih područja s prostora Kine, a detekcija alela je obavljena pomoću specifičnih mikrosatelitnih markera. Alel *Ppd-D1a* je pronađen u 66% sorata nastalih do 1970. Izvor alela *Ppd-D1a* za kineske su oplemenjivače bile tri stare sorte: japanska Akakomugi, te dvije kineske Mazhamai i Youzimai.

Šip i sur. (2010.) ispitivali su učestalost *Ppd-D1a* i *Ppd-D1b* alela u slovačkom i češkom sortimentu ozime pšenice. U istraživanje je bilo uključeno 85 sorata priznatih između 1981. i 2009. Pomoću mikrosatelitnih markera detektirali su obje alelne varijante na *Ppd-D1* lokusu. Rezultati su pokazali da u slovačkom sortimentu prevladava *Ppd-D1a* alel koji je pronađen u 90% sorata, a ove sorte vuku podrijetlo od kineskih sorata. U češkom sortimentu učestalost *Ppd-D1a* alela je manja i iznosi 34%. Razlog tome je taj što češke sorte u svom pedigreu imaju sorte iz Velike Britanije. Na području Velike Britanije nije vršena selekcija na ovaj alel budući da u ranijim istraživanjima nije dokazan utjecaj neosjetljivosti na fotoperiod na povećanje prinosa za to klimatsko područje.

Seki i sur. (2011.) proučavali su rasprostranjenost alela na *Ppd-D1* i *Ppd-B1* lokusima u japanskom oplemenjivačkom sortimentu pšenice. U istraživanje je uključeno 260 sorata pšenice, a genotipizacija je obavljena pomoću PCR metode. Razvijene su specifične PCR početnice za identifikaciju *Ppd-B1a* i *Ppd-B1b* alela. Očekivani PCR produkti za *Ppd-B1a* su 1600 bp, a za *Ppd-B1b* su 1292 bp. Razlika između ovih alela je adicija fragmenta od 308 bp koja je uzrokovala neosjetljivost na fotoperiod. Prisutnost alela za neosjetljivost na fotoperiod, *Ppd-D1a* utvrđena je u 218 od 260 (83,8%) ispitivanih sorata dok je alel *Ppd-B1a* pronađen u 11 sorata (4,2%). Neke sorte su sadržavale i *Ppd-D1a* i *Ppd-B1a*, odnosno obje alelne varijante za neutralni odgovor na dužinu dana. Autori studije smatraju da je izvor alela *Ppd-B1a* stara japanska sorta Shiroboro 21. Osim distribucije *Ppd-D1* i *Ppd-B1* gena u istraživanju je ispitivan i njihov utjecaj na datum klasanja te je dokazan značajan utjecaj *Ppd-B1a* alela na vrijeme klasanja.

Alelnu varijabilnost na *Ppd-D1* lokusu u hrvatskoj germplazmi ozime pšenice istraživali su Petrović i sur. (2012.). U istraživanje je bilo uključeno 40 hrvatskih sorata, a uz varijabilnost na *Ppd-D1* lokusu ispitivana je i varijabilnost na *Xgwm261* lokusu. Mikrosatelitni marker *gwm261* nalazi se na *Xgwm261* lokusu koji je udaljen 0.6 cM od gena *Rht8* smještenog na 2DS kromosomu i koji se često nalazi zajedno s *Ppd-D1* genom. Rezultati su pokazali da je

alel *Ppd-D1a* bio prisutan u 31 od 40 ispitivanih sorata, dok je alel *Ppd-D1b* pronađen u devet sorata. Također, utvrđena je povezanost *Rht8* gena i *Ppd-D1a* alela u 28 hrvatskih sorata što je rezultat talijanskih i ruskih sorata u njihovom pedigreu.

Seki i sur. (2013.) također su istraživali i distribuciju alela *Ppd-A1a*, koji uzrokuje neosjetljivost na fotoperiod. Alela *Ppd-A1a* se povezuje s delecijom od 1085bp. Nishida i sur. (2012.) su kreirali specifične PCR početnice za identifikaciju *Ppd-A1a* koje su korištene u ovoj studiji. Očekivani PRC produkti za *Ppd-A1a* su 338 bp, a za *Ppd-A1b* su 299 bp. U studiju je uključeno 280 kultivara s uzgojnog područja Japana, a alelna varijanta *Ppd-A1a* detektirana je u samo 14 (5%) kultivara. Autori studije smatraju da je izvor alela *Ppd-A1a* stara američka sorta Purple Straw. Osim distribucije, promatran je i učinak *Ppd-A1a* na druga agronomska svojstva. Sorte s ovom alelnom varijantom na *Ppd-A1* lokusu pokazale su veću otpornost na polijeganje kao i poboljšanu otpornost prema hrđi lista.

Kamran i sur. (2013.) su proučavali distribuciju alelnih varijanti na *Ppd-D1* lokusu u germplazmi jarih pšenica. U istraživanje je uključeno 102 kanadskih sorata, a detekcija je obavljena pomoću mikrosatelitnih markera. Utvrdili su da je alel za osjetljivost na fotoperiod veću učestalost imao kod sorata nastalih između 1885. i 1986., dok su sorte nastale nakon 1990. većinom imale alel za neosjetljivost na fotoperiod. Također, utvrdili su pozitivnu korelaciju između alela *Ppd-D1a* i skraćivanja vremena do cvatnje koje je, ovisno o sorti, bilo kraće od 1,52 do 5,83 dana.

### 3. Materijali i metode

#### 3. 1. Biljni materijal

Istraživanje je provedeno na 20 hrvatskih sorata heksaploidne ozime pšenice (*Triticum aestivum* spp. *vulgare* L.) koje su priznate u razdoblju od 1978. do 2010. godine. Sorte su odabrane na osnovi godine priznavanja, zastupljenosti u proizvodnji i području uzgoja (tablica 2).

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

Sorta	Godina	Podrijetlo	Pedigre
1. Osječka 20	1978.	PIO	Osk.6.9-1-64/v-188-M
2. Slavonija	1984.	PIO	Osječanka 20/Osk.4.216-2-76
3. Žitarka	1985.	PIO	Osk.6.30-20/Slavonka/3/Eph.M68/Osk.154-19//Kavkaz
4. Ana	1988.	PIO	Osk.4.216-2-76/Zg 2877-74
5. Srpanjka	1989.	PIO	Osk.4.50-1-77/Zg 2696
6. Demetra	1991.	PIO	Osk.4.216-2-76/Zg 2877-74
7. Divana	1995.	Jost	Favorit/5/Cirpiz/4/J.Kwang/2/Arlas66/Comac./3/Velvet
8. Barbara	1997.	PIO	GO 3135/Žitarka
9. Golubica	1997.	PIO	Slavonija/Gemini
10. Super Žitarka	1997.	PIO	GO 3135/Žitarka
11. Lenta	1997.	AG	Slavonija/Gemini
12. Perla	1997.	AG	nedostupan
13. Kruna	1997.	AG	nedostupan
14. Gabi	1999.	AG	Srpanjka/GK 32-82
15. Marta	2003.	PIO	Aljmašanka/Srpanjka
16. Ines	2004.	AG	Pitoma/Sana//Slavonija2/Sk7
17. Elvira	2005.	PIO	Srpanjka/Kata//Super žitarka
18. Kalista	2005.	AG	Divana/Soissons
19. Dea	2009.	AG	Srpanjka/Brutus
20. Nova Žitarka	2010.	PIO	FS-800/89/Žitarka



Od 20 sorata pšenice, 11 ih je iz sortimenta Poljoprivrednog Instituta u Osijeku (PIO), 7 pripada oplemenjivačkoj kući Agrigenetics d.o.o, Osijek (AG), a jedna oplemenjivačkoj kući Jošt sjeme- istraživanja d.o.o , Križevci.

### **3. 2. Metode**

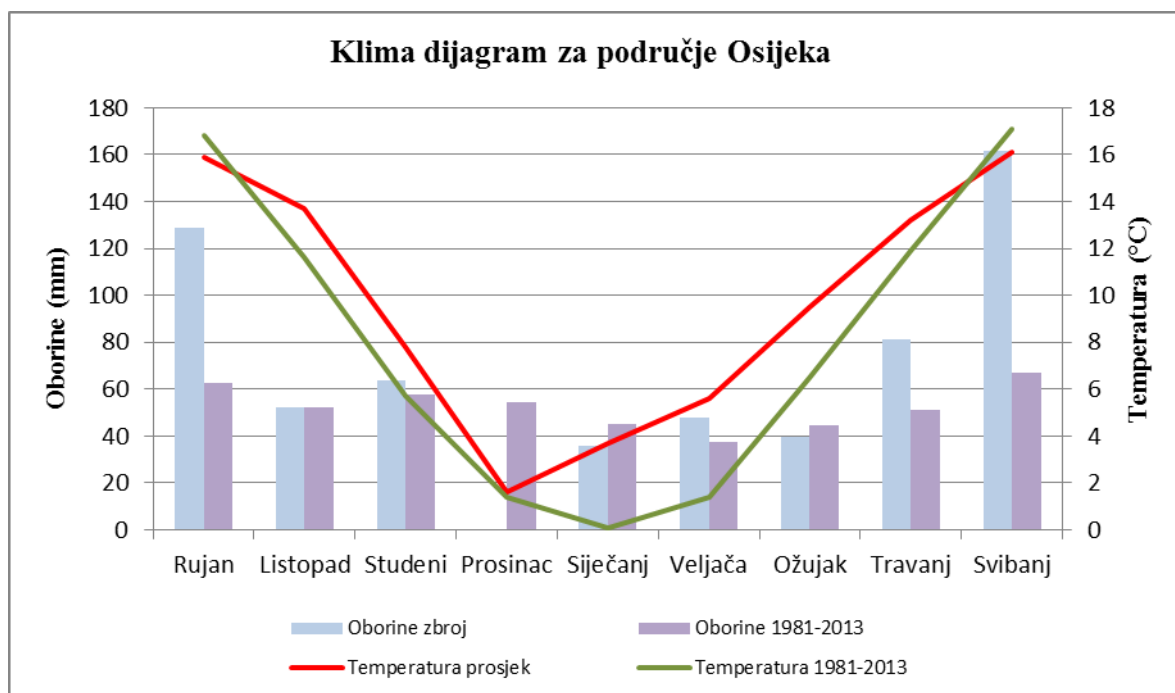
#### **3. 2. 1. Poljski pokus i klimatski uvjeti**

Sve sorte pšenice odabrane za istraživanje postavljene su u poljski pokus (slika 1) u sklopu VIP projekta „Adaptabilnost hrvatskog sortimenta pšenice u uvjetima klimatskih promjena“ tijekom vegetacijske godine 2013./2014. Pokus je postavljen na lokaciji Klisa kod Osijeka. Pokus je zasijan 15. listopada 2013. godine. Svaka sorta posijana je na osnovnu parcelu dužine 5 m, širine 1,25 m, s površinom od 6,25 m<sup>2</sup>. Razmak između redova bio je 12,5 cm. Provedena je standardna agrotehnika za pšenicu.



Slika 1. Poljski pokus tijekom nicanja pšenice (foto original; T. Platz)

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. 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. U prosincu je 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.

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 klananja.

### **3. 2. 2. Laboratorijski pokus**

Ispitivanje varijabilnosti *Ppd* 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. Naklijavanje u klima komori je trajalo 14 dana. Temperatura u klima komori održavana je na 20°C uz svjetlosni režim 12 sati osvjetljenja i 12 sati bez osvjetljenja. Zalijevanje je obavljeno 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 provedena je prema cetil-trimetil-amonij-bromid metodi (CTAB) (Doyle i Doyle, 1987.), modificiranoj prema Grljušić (2003.). Odvagano je 20 mg listova svake sorte koji su stavljani u tarionike prethodno ohlađene tekućim dušikom. Listovi su zatim preliveni tekućim dušikom i smrvljeni u fini prah pomoću tučka. U svaki uzorak dodano je 1000 µL 2% CTAB pufera (1M Tris-HCl pH 8.0; 0,5 Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0; 5 M NaCl; 10% SDS), koji je prethodno bio zagrijan u vodenoj kupelji na 68°C. Nakon toga je sadržaj je iz tarionika izliven u prethodno brojevima označene Eppendorf tubice od 2 ml. Uzorci su zatim vorteksirani te inkubirani na 65°C u vodenoj kupelji 45 minuta uz povremeno okretanje rukom. Nakon inkubacije uzorci u tubicama premješteni su u posudu s ledom te je svakom uzorku dodano 670 µL SEVAG-a (kloroform/izoamilni alkohol 24:1). Nakon dodavanja alkohola, svaki je uzorak pojedinačno protresen rukom okretanjem tubice te stavljen na stalak za mućkanje. Mućkanje je trajalo 30 minuta.



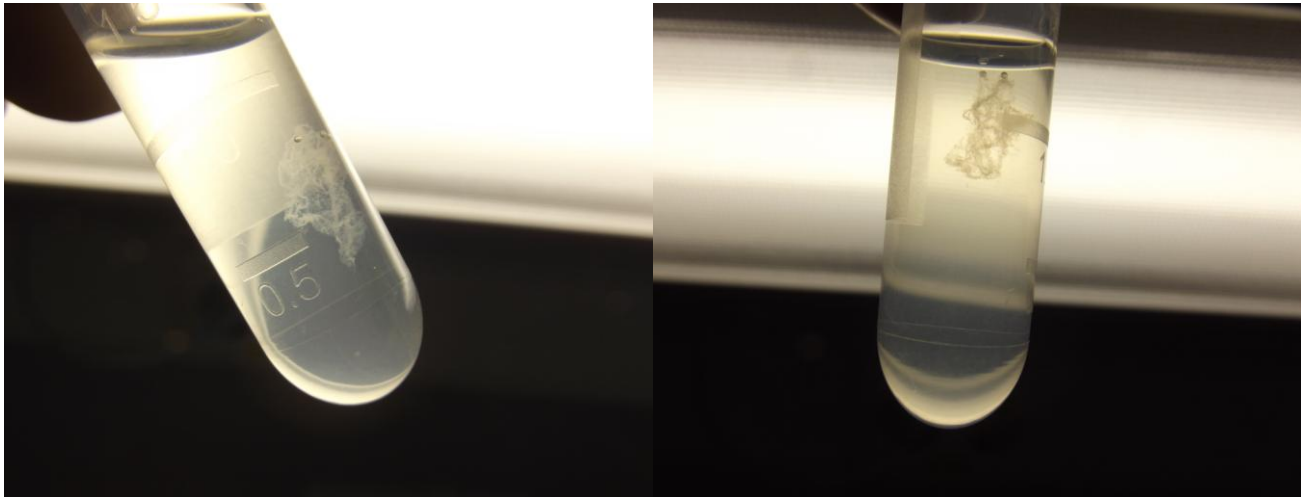
Slika 2 . Centrifugiranje uzoraka (foto original; T. Platz)

Uzorci su nakon mućkanja na stalku centrifugirani 8 minuta brzinom od 14 000 okr/min (slika 2). Centrifugiranjem je odvojena tekuća faza od krute faze koja je zatim pipetom s odrezanim vrhom izdvojena u novi set označenih tubica od 2 ml. Konačni volumen tekuće faze iznosio je 500 - 750  $\mu$ L (slika 3).



Slika 3. Odvajanje tekuće od krute faze (foto original; T. Platz)

U izdvojenu tekuću fazu dodano je 16  $\mu\text{L}$  RNAze. Uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi na stalku za mućkanje 30 minuta, uz povremeno ručno okretanje. Po isteku 30 minuta, u tubice je dodano 650  $\mu\text{L}$  0,7 V hladnog izopropanola te su lagano okretane rukom dok DNA nije postala vidljiva (slika 4 i 5).



Slike 4 i 5. Vidljiva DNA nakon dodavanja izopropanola (foto original T. Platz)

Tubice su ostavljene na sobnoj temperaturi dva sata uz povremeno okretanje rukom. Nakon toga su centrifugirane 1 minutu na 14 000 okr/min, a prilikom centrifugiranja se na dnu tubice stvorila bijela peleta DNA. Tekuća faza pažljivo je izlivena. U svaku je tubicu dodano 500  $\mu\text{L}$  0,2 mM natrij acetata u 76% etanolu kojim je peleta prana oko 30 minuta laganim treskanjem tubice prstom. Tubice su centrifugirane 2 minute pri 14 000 okr/min, a tekuća je faza izlivena. Pranje peleta ponovljeno je u 500  $\mu\text{L}$  amonij acetata u 76% etanolu tijekom 10 minuta. Tubice su zatim ponovno centrifugirane 1 minutu na 14 000 okr/min i tekuća faza je izlivena.

Preostali etanol nakon izlivanja tekuće faze pažljivo je odstranjen pipetom te su otvorene tubice ostavljene u digestoru na sušenju 30 do 45 minuta. Nakon sušenja peletama je dodano 100  $\mu\text{L}$  1  $\times$  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 koja su sadržavala 15 µL čiste DNA i 735 µL TE pufera. Netom prije početka mjerenja uređaj je kalibriran pomoću demineralizirane vode. Za svaki uzorak napravljena su dva ponavljanja. 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.

Koncentracija DNA (izražena u ng/µl) određena je na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbanci prema sljedećoj formuli:

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

Nakon određivanja koncentracije pripremljeni su 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:

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

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

Tablica 3. Koncentracija DNA i PCR razrjeđenje uzoraka

Br.	Sorta	[DNA] ng/ $\mu$ l	PCR razrjeđenje 1:5 ( $\mu$ L)	
			DNA	TE 8.0
1	Osječka 20	241,5	4,14	45,86
2	Slavonija	470,5	2,13	47,87
3	Žitarka	680,75	1,47	48,53
4	Ana	335,8	2,98	47,02
5	Srpanjka	333,33	3,0	47,0
6	Demetra	249,8	4,00	46,00
7	Divana	622,5	1,61	48,39
8	Barbara	357,0	2,8	47,2
9	Golubica	445,5	2,24	47,76
10	Super Žitarka	423,8	2,36	47,64
11	Gabi	910,3	1,1	48,9
12	Elvira	401,75	2,49	47,51
13	Kalista	819,5	1,22	48,78
14	Dea	711,3	1,41	48,59
15	Nova Žitarka	783,5	1,28	48,72
16	Marta	1892	0,52	49,48
17	Ines	910,3	1,09	48,91
18	Lenta	767,5	1,30	48,70
19	Perla	839	1,19	48,81
20	Kruna	706	1,41	48,59

Koncentracija DNA provjerena je elektroforezom uspoređujući ju s lambda ( $\lambda$ )-DNA. Koncentracija  $\lambda$  -DNA je unaprijed određena. Pripremljen je 0,75% agarozni gel u  $1 \times$  TAE puferu na koji su nanošeni uzorci pomoću pipete. Za pripremu uzoraka za elektroforezu korišteno je 3  $\mu$ L razrijeđene DNA, 2  $\mu$ L STOP miksa ( $5 \times$  SGB) (1M Tris-HCl pH 8.0; 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA; Bromfenolblue boja; 87%- tni glicerol; SDS) i 2  $\mu$ L ultra čiste vode (H<sub>2</sub>O). Za uzorke lambda-DNA uzeto je 1  $\mu$ L  $\lambda$ -DNA, 2  $\mu$ L Stop miksa i 7  $\mu$ L d.d. H<sub>2</sub>O. Uvjeti elektroforezu bili su sljedeći 80 V; 60 mA; 5 W. Za uzorke koji su pokazali lošu kvalitetu spektrofotometrijskom analizom i elektroforezom s  $\lambda$  -DNA, izolacija DNA je ponovljena.

### 3. 2. 2. Metoda mikrosatelitnih markera

U ispitivanju varijabilnosti *Ppd* gena pšenice korištene su tri različite sekvence mikrosatelitnih početnica smještene na D genomu pšenice, nazvane *Ppd-D1\_F1*, *Ppd-D1\_R1* i *Ppd-D1\_R2*. Kada su uparene, početnice *Ppd-D1\_F1* i *Ppd-D1\_R1* daju PCR fragmente od 414 bp, dok su PCR fragmenti od 288 bp rezultat para početnica *Ppd-D1\_F1* i *Ppd-D1\_R2*. Specifične mikrosatelitne početnice markera za *Ppd-D1* lokus kreirali su Beales i sur. (2007.). Sekvence početnica za identifikaciju specifičnog alela, lokus i temperatura nalijeganja početnica prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Svojstva parova početnica specifičnih mikrosatelitnih markera

<i>Ppd</i> alel	L o k u s	Sekvenca početnice (5' → 3')		
		<i>Ppd-D1_F1</i>	<i>Ppd-D1_R1</i>	<i>Ppd-D1_R2</i>
<i>D1a</i>	2DS	ACGCCTCCCACT	GTTGGTTCAAACAG	CACTGGTGGTAGCTGA
<i>D1b</i>	2DS	ACACTG	AGAGC	GATT
<b>T<sub>a</sub> (°C)*</b>		<b>53 °C</b>	<b>51°C</b>	<b>55°C</b>

\* **T<sub>a</sub> (°C)** – temperatura nalijeganja početnica

Amplifikacija specifičnih mikrosatelitnih početnica za identifikaciju *Ppd-D1* gena obavljena je prema protokolu Beales i sur. (2007.). Prije pripreme reakcijske smjese obavljena je optimizacija PCR reakcije. Koncentracije za reakcijsku smjesu navedeni su u tablici 5.



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

Reakcijska smjesa	Koncentracija		Volumen po jednoj reakciji
	ishodišna	radna	
PCR pufer	5 ×	1 ×	1,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	0,75 µL
dNTP Mix	2,5 mM	0,2 mM	0,115 µL
L- početnica	10 µL	0,4 µL	0,1 µL
R1- početnica	10 µL	0,4 µL	0,1 µL
R2- početnica	10 µL	0,4 µL	0,1 µL
Taq polimeraza	5 U/µL	0,05 U/µL	0,11 µL
Genomska DNA	2 µL		3 µL
d.d. H <sub>2</sub> O	-	-	10,65 µL
Total			13,5 µL

PCR reakcija provedena je prema sljedećem programu (Beales i sur.,2007.):

1. korak 5 minuta na 94°C;
2. korak 37 ciklusa od :
  - 50 sekundi na 94°C,
  - 40 sekundi na 52°C,
  - 1 minute na 72°C;
3. završni korak 10 minuta na 72°C.

Provjera PCR produkata izvršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Očekivani fragmenti PCR produkata prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Očekivani produkti PCR reakcije za *Ppd-D1*

<b>Aleli</b>	<b>Očekivani fragmenti</b>
<i>Ppd-D1a</i> (neosjetljivi tip)	288
<i>Ppd-D1b</i> (osjetljivi tip)	414

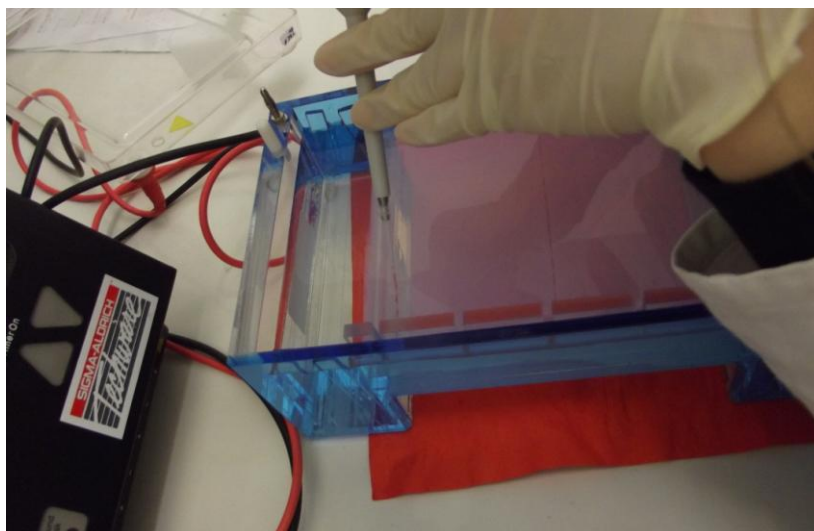
Prije pripreme reakcijskih smjesa za PCR obavljeno je razrjeđivanje oligonukleotidnih početnica dodavanjem TE pufera prema tablici 7. U pripremljene obilježene tubice od 0,5 ml dodano je 10  $\mu$ L razrijeđenih oligonukleotida i 100  $\mu$ L d.d. H<sub>2</sub>O.

Tablica 7. Razrjeđivanje oligonukleotidnih početnica

<b>Početnice markera</b>	<b>TE 8.0 (<math>\mu</math>L)</b>
<i>PpD-D1_R1</i>	101
<i>PpD-D1_R2</i>	102
<i>PpD-D1_L</i>	125

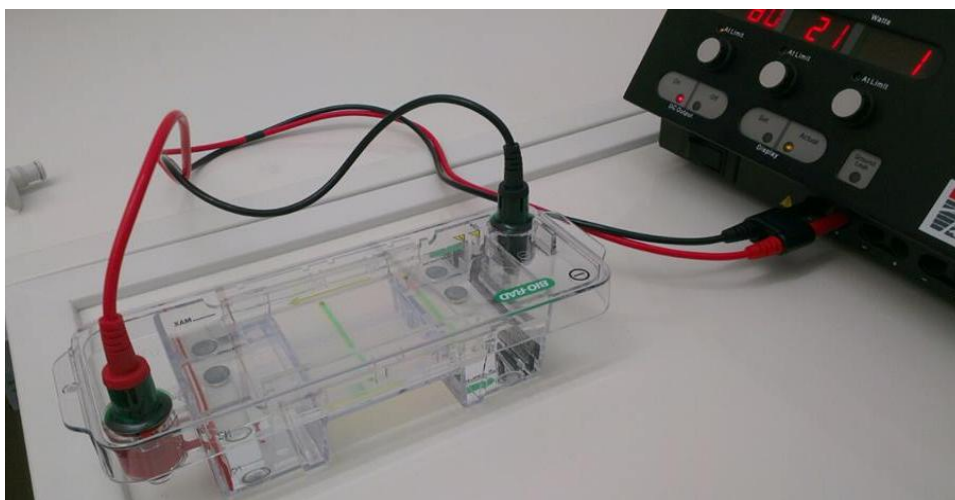
### 3. 2. 2. 3. Elektroforeza

Produkti SSR amplifikacije nanoseni su na 2% agarozni gel u 1  $\times$  TBE puferu. Od svakog uzorka u jažice gela ispipetirano je 5  $\mu$ L. Veličina agaroznog gela je bila 7 $\times$ 10 cm, i debljine 1 cm. Za pripremu 2%-tnog gela je bilo potrebno: 60 ml 1  $\times$  TBE pufera i 1,2 g agaroze. Korištena Lonza SeaKem® LE agaroz. Gelovi su pripremljeni prema slijedećem 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. Nekoliko je puta bila izvađena i lagano miješana. Nakon toga je ohlađena miješanjem na oko 60°C 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 kadu u koju su smještena dva češlja od 15 jažica te ostavljen da se hladi na sobnoj temperaturi dok se ne stvrdne.



Slika 6. Nanošenje uzorka u jažice agaroznog gela (foto original; T. Platz)

Za elektroforezu je korišten uređaj Bio-Rad Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT (slika 6 i 7), a uvjeti su bili sljedeći: 80 V; 60 mA; 5 W. Trajanje elektroforeze bilo je između 35 i 45 min. Kao standard za utvrđivanje veličine fragmenata PCR produkata korištena je Promega<sup>®</sup> 100bp DNA Ladder s rasponom veličine fragmenata od 100 bp do 1000 bp, zajedno s pripadajućom bojom (6x Blue/Orange Loading Dye).



Slika 7. Elektroforeza produkata PCR reakcije (foto original; T. Platz)

Slike gela s PCR produktima dobivene su pomoću Syngene<sup>®</sup> 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 8). Izrađene su tablice prisutnosti gena za svaku sortu te je izvršena usporedba s datumom klasanja.



Slika 8. G:Box uređaj za snimanje gela nakon elektroforeze (foto original; T. Platz)

## 4. Rezultati

### 4. 1. Varijabilnost datuma klasanja sorata pšenice u poljskom pokusu

Sve sorte uključene u pokus klasale su između 21. 4. i 29. 4., odnosno razlika u datumu klasanja između najranije i najkasnije bila je 8 dana. Očekivano, sorta Srpanjka je najranije klasala, 21.4. Najkasnija je bila sorta Ines koja je isklasala 29.4. Sorte Demetra i Gabi klasale su 23.4. , a sorta Divana 24.4. Zatim su klasale sorte Ana, Dea, Marta, Nova Žitarka i Slavonija, i to 25.4. 26.4. su klasale sorte Golubica, Osječka 20, Perla i Žitarka, a 27.4. je klasala sorta Kruna. Naposljetku, 28.4. su klasale sorte Barbara, Elvira (PIO), Kalista, Lenta i Super Žitarka. Pregleda datuma klasanja nalazi se u tablicama 8 i 9.

Tablica 8: Datumi klasanja pšenice u poljskom pokusu, sorte 1-10

Sorta	Datum klasanja	Sorta	Datum klasanja
1. Srpanjka	21.4.	11. Osječka 20	26.4.
2. Demetra	23.4.	12. Perla	26.4.
3. Gabi	23.4.	13. Žitarka	26.4.
4. Divana	24.4.	14. Kruna	27.4.
5. Ana	25.4.	15. Barbara	28.4.
6. Dea	25.4.	16. Elvira PIO	28.4.
7. Marta	25.4.	17. Kalista	28.4.
8. Nova Žitarka	25.4.	18. Lenta	28.4.
9. Slavonija	25.4.	19. Super Žitarka	28.4.
10. Golubica	26.4.	20. Ines	29.4.

Treba napomenuti da su u svim mjesecima, osim prosinca i svibnja, srednje mjesečne temperature zraka tijekom vegetacije pšenice odstupale od višegodišnjeg prosjeka za 2-3°C, a u veljači za 4°C što je dovelo do ranijeg vlatanja i klasanja.

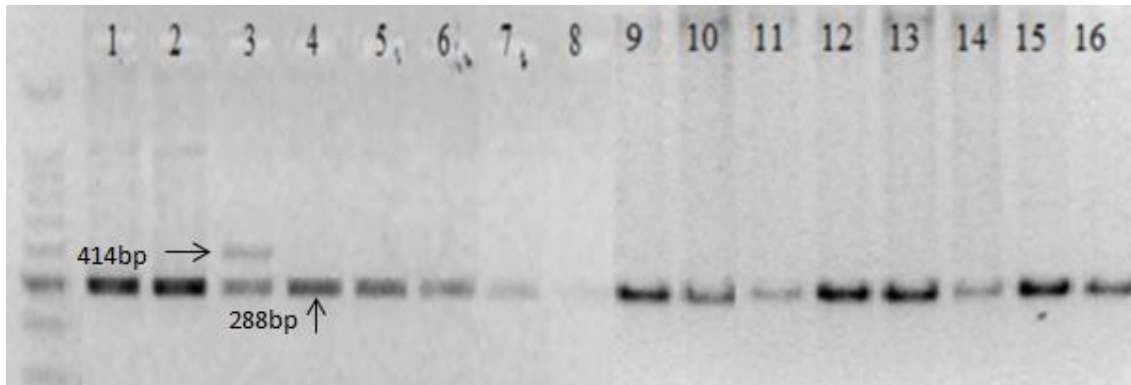
#### 4. 2. Ispitivanje varijabilnosti na *Ppd-D1* lokusu

Nakon obrade slika gelova s PCR produktima u GeneTools programu, identificirani su aleli *Ppd-D1* lokusa na kratkom kraku 2D kromosoma 20 hrvatskih sorata pšenice. Rezultati navedeni u tablici 9.

Tablica 9. Varijabilnost na *Ppd-D1* lokusima 20 hrvatskih sorata pšenice

Br.	Sorta	Aleli na <i>Ppd-D1</i> lokusu	
		<i>Ppd-D1a</i> (neosjetljivost na fotoperiod)	<i>Ppd-D1b</i> (osjetljivost na fotoperiod)
1	Slavonija	+	
2	Žitarka	+	
3	Barbara	+	+
4	Demetra	+	
5	Divana	+	
6	Osječka 20	+	
7	Srpanjka	+	
8	Golubica	+	
9	Elvira (PIO)	+	
10	Marta	+	
11	Gabi	+	
12	Ines	+	
13	Lenta	+	
14	Perla	+	
15	Kruna	+	
16	Kalista	+	
17	Nova Žitarka	+	
18	Dea		+
19	Ana	+	
20	Super Žitarka	+	

Očitavanjem rezultata za *Ppd-D1* lokus, dobiveni su očekivani PCR produkti od 288 bp za *Ppd-D1a* i 414 bp za *Ppd-D1b* alel.



Slika 9. Identifikacija alela *Ppd-D1* lokusa kod hrvatskih sorata pšenice, uzorci 1 – 16  
(foto original; T. Platz)

Kod 18 sorata pšenice identificiran je *Ppd-D1a* na *Ppd-D1* lokusu što je i očekivano budući da većina hrvatskih sorata pripada u rane ili srednje rane sorte. Samo je kod sorte Dea pronađen *Ppd-D1b* alel. Kod sorte Barbara pronađeni su i *Ppd-D1a* i *Ppd-D1b* aleli što upućuje na to da je ova sorta heterozigot za promatrano svojstvo (slika 9, tablica 9).

## 5. Rasprava

### 5.1. Varijabilnost na na *Ppd-D1* lokusu i visina pšenice

Razvoj visoko produktivnih sorata pšenice koje imaju nisku stabljiku i visoku otpornost na polijeganje te koje su u isto vrijeme i ranozrele jedan je od glavnih oplemenjivačkih ciljeva u mnogim zemljama već dugi niz godina. Reakcija biljke na duljinu dana kontrolirana je *Ppd* genima (Šip i sur., 2010.), a dosadašnja istraživanja su potvrdila da najjači utjecaj na neosjetljivosti na fotoperiod ima alel *Ppd-D1a* (Worland, 1996.). Za ispitivanje alelnih varijanti na *Ppd-D1* lokusu korišteni su specifični mikrosatelitni markeri koje su razvili Beales i sur. (2007.). PCR produkti od 288 bp su indikatori prisutnosti alela za fotoperiodsku neosjetljivost *Ppd-D1a*, dok su produkti od 414 bp indikatori prisutnosti alela *Ppd-D1b*, alela za fotoperiodsku osjetljivost. *Ppd-D1* gen je introducirao početkom 20.st. iz stare japanske sorte Akakomugi (Salvi i sur., 2013.).

Rezultati istraživanja pokazali su da je alel *Ppd-D1a* prisutan u gotovo svim hrvatskim sortama pšenice koje su bile uključene u istraživanje. Ovaj alel pronađen je u 18 (Osječka 20, Slavonija, Žitarka, Srpanjka, Demetra, Divana, Golubica, Super Žitarka, Ana, Gabi, Elvira, Kalista, Dea, Nova Žitarka, Marta, Ines, Lenta, Perla i Kruna) od 20 sorata, odnosno u 90% sorata, a slične rezultate potvrđuju Petrović i sur. (2012.). U sorti Dea identificiran je alel *Ppd-D1b*, dok je sorta Barbara, imala je obje alelne varijante te je ona heterozigot za svojstvo odgovora na fotoperiod.

*Ppd-D1a* alel široko je rasprostranjen u većini europskih (Worland, 1996.) i kineskih na fotoperiod neosjetljivih sorata. Yang i sur. (2009.) su utvrdili u studiji provedenoj na 926 kultiviranih sorata pšenice s prostora Kine da je učestalost *Ppd-D1a* alela 66% odnosno pronađen je u 442 sorte. Seki i sur. (2011.) proučavali su rasprostranjenost alela na *Ppd-D1* lokusu u japanskom oplemenjivačkom sortimentu pšenice. Prisutnost alela *Ppd-D1a* utvrđena je u 218 od 260 (83.8%) ispitivanih sorata. Dominantnost u učestalosti pojavljivanja *Ppd-D1a* alela nad alelom *Ppd-D1b* pronašli su i Šip i sur. (2010.) u istraživanju provedenom na germplazmi ozimih sorata pšenice srednje Europe, posebice onih sorata koje pripadaju slovačkom i češkom sortimentu. Alel za neosjetljivost na fotoperiod pronađen je u 36 od 40 slovačkih sorata (90%) te 29 od 85 (34%) sorata iz češkog sortimenta. Niža učestalost pojave *Ppd-D1b* u češkom sortimentu rezultat je korištenja germplazme iz Velike Britanije u ranijim



etapama oplemenjivačkih programa. Kamran i sur. (2013.) su proučavali distribuciju alelnih varijanti na *Ppd-D1* lokusu u germplazmi jarih kanadskih pšenica. Utvrdili su da je alel za osjetljivost na fotoperiod veću učestalost imao kod sorata nastalih između 1885. i 1986., dok su sorte nastale nakon 1990. većinom imale alel za neosjetljivost na fotoperiod.

Temeljni ciljevi oplemenjivačkog programa pšenice u Hrvatskoj su stvaranje sorte pšenice koja se odlikuje visokim prinosom i kvalitetom zrna, niskom stabljikom, otpornošću na polijeganje, zimu i najznačajnije bolesti pšenice te koja je u isto vrijeme ranozrela. Jedan od najznačajnijih trenutaka u oplemenjivanju u Hrvatskoj zbio se krajem 50-ih godina prošlog stoljeća početkom introdukcije talijanskih i ruskih kultivara čiji je predak sorta japanska sorta Akakomugi, nositelj *Ppd-D1a* alela (Salvi i sur., 2013.). Od talijanskih kultivara isticali su se San Pastore, Libellula i Leonardo čije su glavne značajke visok i stabilan prinos, ranozrelost i otpornost na polijeganje. Najznačajniji introducirani ruski kultivari su Bezostaja 1, Kavkaz i Aurora. Osobine ovih kultivara su otpornost na zimu i visoka kvaliteta zrna (Martinčić i Kozumplik, 1996.). *Ppd-D1a* alel kojeg posjeduju ove sorte utjecao je na njihovu dobru prilagodbu klimatskim uvjetima Istočne Slavonije i omogućio da budu roditelji u daljnjim križanjima. Na području Istočne Slavonije prevladava umjereno topla kišna klima. Srednja temperatura najhladnijeg mjeseca u godini je između -3 i -18°C, a najtoplijeg viša od 10 °C, a niža od 22 °C uz mnogo oborina početkom ljeta, a malo u kasnom ljetu (Penzar i Penzar, 2000.). U ovakvim uvjetima, nedostatka vlage i visoke temperature tijekom ljetnih mjeseci pravilno nalijevanja zrna je ometano te zrno ostaje šturo i sitno, a prinos se smanjuje. Prekid nalijevanja zrna može se izbjeći uzgojem kultivara koji su neosjetljivi na fotoperiod, odnosno onih koji posjeduju *Ppd-D1a* alel budući da takvi kultivari cvjetaju neovisno o duljini dana, pa nalijevanje zrna završava prije nastupa razdoblja visokih temperatura (Lanning i sur., 2012.).

Upravo činjenica da su talijanske i ruske sorte visoko zastupljene u pedigreu hrvatskih kultivara kao posljedicu ima visoku rasprostranjenost *Ppd-D1a* alela u germplazmi hrvatske ozime pšenice što se podudara s rezultatima ove studije. Najznačajnije sorte koje su nastale kao rezultat oplemenjivačkog programa koji je uključivao talijanske i ruske sorte su Dubrava (1968.), Slavonka (1970.), Tena (1973.), Zlatna Dolina (1974.), Osječka crvenka (1976.) i Osječka 20 (1980.) (Bede, 1992.) koje su kasnije poslužile kao osnova za stvaranje novih kultivara ozime pšenice visokog rodnog potencijala i kvalitete koje su se ujedno odlikovale i ranozrelošću. Najznačajnije su Žitarka, Srpanjka, Ana i Demetra, priznate 1985., 1988., 1989. i 1991. Osječka 20 jedan je od roditelja Slavonije, priznate 1984., u kojoj je determiniran

*Ppd-D1a* alel. Slavonija je zatim poslužila kao roditelj u križanjima iz kojih su nastale Golubica (1997.) i Lenta (1997.) koje također imaju alel koji uzrokuje neosjetljivost na fotoperiod. Slavonka (1970.) nalazi se u pedigreu Žitarka koja je korištena kao roditelj u mnogim križanjima. Sorte koje su ispitivane u ovoj studiji, a jedan od roditelja im je bila Žitarka su Super Žitarka (1997.) i Nova Žitarka (2010.) i kod obje je utvrđena alelna varijanta *Ppd-D1a*. Žitarka je poslužila i kao roditelj za križanje iz kojeg je nastala sorta Barbara kod koje su utvrđene obje alelne varijante na *Ppd-D1* lokusu. Srpanjka, jedna od najranijih hrvatskih sorata, također je često korištena u križanjima. Sorte nastale iz križanja u kojima je Srpanjka korištena kao roditelj su Gabi (1999.), Marta (2003.) i Elvira (2005.). Rezultati ovog istraživanja potvrdili su postojanje *Ppd-D1a* alela i u ovim sortama.

Srpanjka je također bila i jedan od roditelja u križanju koje je rezultiralo sortom Dea. No za razliku od ostalih sorata korištenih u ovom istraživanju, jedino je kod sorte Dea detektirana alelna varijanta *Ppd-D1b* koja uzrokuje osjetljivost na duljinu dana. Razlog tome je drugi roditelj korišten u križanju, njemačka sorta Brutus. U Njemačkoj germplazmi prevladava alel za osjetljivost na duljinu dana, *Ppd-D1b*, koji je unesen preko japanske sorte Norin 10. Razlog većoj pojavi učestalost ovog alela u odnosu na *Ppd-D1a* je njegov utjecaj na bolju prilagodbu pšenice na niže ljetne temperature i obilnije kiše tijekom ljetnih mjeseci.

U ovom istraživanju kod sorte Barbara detektirani su PCR fragmenti i od 288bp i od 414 bp što upućuje na to da je navedena sorta heterozigot za svojstvo osjetljivosti na fotoperiod. Ovakvi rezultati mogu sugerirati i na nespecifičnost primijenjenih početnica, odnosno njihovo nespecifično vezanje za neki drugi niz parova baza koje ne predstavljaju ciljani gen te 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, a slične slučajeve navode Yang i Liu (2006.).

Kako bi se ispitao stvarni utjecaj *Ppd* gena svojstvo fotoperiodizma u poljskim pokusima, tijekom vegetacije je praćen razvoj biljaka i zabilježen datum klasanja. Rezultati dobiveni uspoređivanjem datuma klasanja i prisutnosti *Ppd-D1a*, odnosno *Ppd-D1b* alela su nedosljedni. Kod svih sorata je pronađene *Ppd-D1a* alel, osim kod sorata Dea (*Ppd-D1b*) i Barbara (obje alelne varijante). Sorte Srpanjka, Demetra i Gabi najranije su isklasale, 21.4. odnosno 23.4. Sorta Dea klasala je 25.4. dok su sorte Barbara, Elvira, Kalista, Lenta, Super Žitarka i Ines najkasnije klasale, 28.4. odnosno 29.4. Iz ovih podataka jasno su vidljive velike

razlike u datumu klananja između najranije sorte (Srpanjka) i najkasnije (Ines) iako je u obje sorte detektiran alel *Ppd-D1a*. Razlog tome može biti što ranozrelost kontroliraju tri glavne grupe gena: gena za odgovor na vernalizaciju (*Vrn*), odgovor na fotoperiod (*Ppd*) te gena koji utječu na samu ranozrelost (*Eps*) (Kamran i sur., 2013., White i sur., 2008.). Isto tako, visoke temperature tijekom siječnja i veljače koje su bile veće za 3-4°C od prosjeka, kao i nedostatak oborina u prosincu mogli su utjecati na datum klananja.

S obzirom na postupno povećavanje prosječnih mjesečnih temperatura na našim područjima i pojave ekstremnih klimatskih uvjeta, kao što su dugotrajna razdoblja suše ili razdoblja s povećanom količinom oborina, potrebno su daljnja istraživanja varijabilnosti na *Ppd* lokusima što većeg broja sorata, kao i procjena utjecaja ovih gena na različita morfološka i agronomska svojstva pšenice. Nužno je istraživanja usmjeriti i prema ostala dva *Ppd* lokusa, *Ppd-A1* i *Ppd-B1*, budući da je dokazan njihov interaktivni učinak na ranozrelost. Također, potrebno je i daljnje razvijanje molekularnih markera pomoću kojih će se s većom preciznošću moći identificirati spomenuti geni. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem mogu se u budućnosti iskoristiti u oplemenjivačkim programima.

## 6. Zaključak

Istraživanje je provedeno u svrhu ispitivanja varijabilnosti alela na *Ppd-D1* lokusu povezanim s *Ppd* genom koji uzrokuje neosjetljivost na fotoperiod kod hrvatskih sorata. U tu svrhu korišteni su specifični mikrosatelitni markeri. Također je ispitivan i utjecaja navedenih alelnih varijanti na datum klasanja biljke u poljskom pokusu tijekom vegetacijske godine 2013./2014.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Na *Ppd-D1* lokusu identificirana su dva različita alela od kojih je najzastupljeniji bio alel za neosjetljivost na fotoperiod *Ppd-D1a* od 288 bp, prisutan u 18 od 20 (90%) ispitivanih sorata.
2. Alel za osjetljivost na fotoperiod *Ppd-D1b* od 414 bp pronađen je samo u jednoj hrvatskoj sorti (Dea).
3. Obje alelne varijante i *Ppd-D1a* i *Ppd-D1b* pronađene su u sorti Barbara što ukazuje na njezinu heterozigotnost za ovo svojstvo, ali i na moguću nespecifičnost mikrosatelitnih markera.
4. Rezultati dobiveni uspoređivanjem datuma klasanja i prisutnosti *Ppd-D1a*, odnosno *Ppd-D1b* alela su nedosljedni, što je najvjerojatnije rezultat ekstremnih klimatskih uvjeta tijekom vegetacijske sezone, ali ukazuje i na moguće drugačije mehanizme regulacije ranozrelosti kod ozime pšenice.

## 7. Popis literature

1. Addisu , M.,Snape, J.W.,Simmonds , J. R., Gooding, M.J.(2010.): Effects of reduced height (Rht) and photoperiod insensitivity (Ppd) alleles on yield of wheat in contrasting production systems. *Euphytica*, 172 (2):169-181
2. Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J.W., Laurie, D.A. (2007.): A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, vol 115(5): 721-733
3. Bede, M, Martinčić, J., Drezner, G. (1992.): Stanje i daljnji pravci u oplemenjivanju pšenice na Poljoprivrednom institutu u Osijeku. *Sjemenarstvo*, vol 9(4-5): 235-240
4. Borojević, K., Borojević, K. (2005.): Historic role of the wheat variety Akakomugi in Southern and Central European wheat breeding programs. *Breeding Science*, 55: 253-256.
5. Borner, A., Korzun, V., Worland, A.J. (1998.): Comparative genetic mapping of loci affecting plant height and development in cereals. *Wheat: Prospects for Global Improvement*, 311-314
6. Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. (2008.): Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transaction of the Royal Society* 363: 557-572.
7. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987.): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
8. Dyck, J.A., Matus-Cádiz, M. A., Hucl, P., Talbert, L., Hunt, T., Dubuc, J. P., Nass, H., Clayton, G., Dobb, J., Quick, J. (2004.): Agronomic Performance of Hard Red Spring Wheat Isolines Sensitive and Insensitive to Photoperiod. *Crop Science*, vol 44: 1976–1981.
9. Foulkes, M.J., Sylvester-Bradley, R., Worland, A.J., Snape, J.W. (2004.): Effects of a photoperiod-response gene *Ppd-D1* on yield potential and drought resistance in UK winter wheat. *Euphytica*, vol 135(1): 63-73
10. Gagro, M. (1997.): Ratarstvo obiteljskog gospodarstva: žitarice i zrnate mahunarke, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb

11. Grljušić, S. (2003.): Genetska varijabilnost kultivara crvene djeteline (*Trifolium pratense* L.) nakon selekcije u brdsko-planinskim uvjetima. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb
12. Guo, Z., Song, Y., Zhou, R., Jia, J. (2009.): Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene. *New Phytol*, vol 185(3): 841-851
13. Jia, J. i suradnici (2013.): *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature*, vol 496: 91-95
14. Kamran, A., Randhawa, H.S., Pozniak, C., Spaner, D.(2013.): Phenotypic effects of the flowering gene complex in Canadian spring wheat germplasm. *Crop Science*, vol 53:84–94
15. Kereša S., Barić, M., Horvat, M., Habuš Jerčić, I. (2008.): Mehanizmi tolerantnosti biljaka na sušu i njihova genska osnova kod pšenice. *Sjemenarstvo*, vol 25(1): 35 – 45
16. Kovačević, V., Rastija, M. (2009.): Osnove proizvodnje žitarica – interna skripta, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
17. Korzun, V., Röder, M. S., Worland, A. J., Börner, A. (1997.): Mapping of the dwarfing (*Rht12*) and vernalisation response (*Vrn1*) genes in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breeding*, 116: 227-232.
18. Laurie, D. A., Pratchett, N., Bezant, J. H., Snape, J. W. (1995.): RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Genome*, vol 38: 575-585.
19. Martinčić, J., Kozumplik, V. (1996.): Oplemenjivanje bilja – teorija i metode, ratarske kulture, Sveučilište Josipa Jurja Strossmajera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
20. Miralles, D.J., Richards, R.A. (2000.): Responses of Leaf and Tiller Emergence and Primordium Initiation in Wheat and Barley to Interchanged Photoperiod. *Annals of Botany*, vol 85 (5): 655-663

21. Nishida, H., Yoshida, T., Kawakami, K., Fujita, M., Long, B., Akashi, Y., Laurie, D.A., Kato, K. (2013): Structural variation in the 5' upstream region of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-A1a* and *Ppd-B1a* identified in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), and their effect on heading time. *Molecular breeding*, vol 31(1): 21-37
22. Plaschke, J., Ganai, 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.
23. Penzar, I., Penzar, B. (2000.): *Agrometeorologija. Školska knjiga*, Zagreb, 155-165
24. Pestsova, E., Roder, M. (2002.): Microsatellite analysis of wheat chromosome 2D allows the reconstruction of chromosomal inheritance in pedigrees of breeding programmes. *Theoretical and Applied Genetics*, vol 106 (1): 84-91
25. Petrović, S., Marić, S., Čupić, T., Drezner, G., Karsai, I. (2012.): Distribution of allelic variants of hexaploid wheat germplasm at *Xgwm261* and *Ppd-D1* locus. *Poljoprivreda*, 18 (2): 25-29.
26. Rawson, H.M., Richards, R.A. (1993.): Effects of high temperature and photoperiod on floral development in wheat isolines differing in vernalisation and photoperiod genes. *Field Crops Research*, vol 32 (3-4): 181-192
27. Seki, M., Chono, M., Matsunaka, H., Fujita, M., Oda, S., Kubo, K., Kiribuchi-Otobe, C., Kojima, H., Nishida, H., Kato, K. (2011.): Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. *Breeding Science*, vol 61: 405-412
28. Seki, M. i sur. (2013.): Distribution of photoperiod-insensitive allele *Ppd-A1a* and its effect on heading time in Japanese wheat cultivars. *Breeding Science*, vol 63 (3): 405-412
29. Snape, J.W., Butterworth, K., Whitechurch, E., Worland A.J. (2001.): Waiting for fine times: genetics of flowering time in wheat. *Euphytica*, vol 119(1-2):185-190
30. Šip, V., Chrpova, J., Žofajova, A., Pankova, K., Užik, M., Snape, J.W. (2009.): Effects of specific *Rht* and *Ppd* alleles on agronomic traits in winter wheat cultivars grown in middle Europe. *Euphytica*, vol 172:221-233

31. Šip, V., Chrpova, J., Žofajova, A., Milec, Z., Mihalik, D., Pankova, K., Snape, J.W. (2010.): Evidence of selective changes in winter wheat in middle-European environments reflected by allelic diversity at loci affecting plant height and photoperiodic response. *The Journal of Agricultural Science*, vol 149(3):313-326
32. Worland, A.J. (1996.): The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. *Euphytica*, vol 89(1): 49-57
33. 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.
34. 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>].
35. Yang, F.P.; Zhang, X.K.; Xia, X.C.; Laurie, D.A.; Yang, W.X.; He Zhonghu (2009.): Distribution of the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* allele in Chinese wheat cultivars. *Euphytica*, vol 165 (3): 445-452.

#### **Mrežni izvori:**

1. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>
2. <http://maswheat.ucdavis.edu/>
3. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>
4. <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/>
5. FAO , <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>



## 8. Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati alelnu varijabilnost *Ppd-D1* lokusa za reakciju na duljinu dana u 20 hrvatskih ozimih pšenica pomoću specifičnih mikrosatelitnih početnica, te rezultate usporediti s datumom klasanja u poljskim pokusima. Identificirane su dvije različite alelne varijante na *Ppd-D1* lokusu: *Ppd-D1a* od 288bp i *Ppd-D1b* od 414 bp. Alelna varijanta *Ppd-D1a* bio je prisutan u 18 od 20 (90%) sorata uključenih u istraživanje, što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima. Alelna varijanta *Ppd-D1b* detektirana je u samo jednoj sorti, sorti Dea. Obje alelne varijante, *Ppd-D1a* i *Ppd-D1b*, pronađene su u sorti Barbara što ukazuje na heterozigotnost ove sorte na ispitivano svojstvo. Rezultati dobiveni uspoređivanjem datuma klasanja i prisutnosti *Ppd-D1a*, odnosno *Ppd-D1b* alela su nedosljedni, što je najvjerojatnije rezultat ekstremnih klimatskih uvjeta tijekom vegetacijske godine 2013./2014.

## 9. Summary

The aim of this study was to determine the variability of *Ppd-D1* locus for photoperiod response in 20 Croatian winter wheat varieties using specific microsatellite primers and to compare the results with heading date wheat heading date obtained from field trial. Two different alleles were determined on *Ppd-D1* locus *Ppd-D1a* from 288bp and *Ppd-D1b* from 414 bp. Among 20 cultivars, 18 (90%) carried photoperiod-insensitive allele *Ppd-D1a*. One cultivar, Dea, carried photoperiod-sensitive *Ppd-D1b* allele. Both photoperiod-insensitive and photoperiod-sensitive alleles were found in cultivar Barbara, what suggests that this cultivar is heterozygous for this trait. When comparing heading date and *Ppd-D1a* and *Ppd-D1b* allele distribution, results of this study were inconclusive, most likely because extreme climate conditions during vegetation season 2013/2014.

## 10. Popis tablica

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

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

Tablica 3. Koncentracija DNA i PCR razrjeđenje uzoraka

Tablica 4. Svojstva parova početnica specifičnih mikrosatelitnih markera

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

Tablica 6. Očekivani produkti PCR reakcije za *Ppd-D1*

Tablica 7. Razrjeđivanje oligonukleotidnih početnica

Tablica 8. Datumi klasanja pšenice u poljskom pokusu

Tablica 9. Varijabilnost na *Ppd-D1* lokusima 20 hrvatskih sorata pšenice

## 11. Popis slika

Slika 1. Poljski pokus tijekom nicanja pšenice (foto original; T. Platz)

Slika 2 . Centrifugiranje uzoraka (foto original; T. Platz)

Slika 3. Odvajanje tekuće od krute faze (foto original; T. Platz)

Slike 4 i 5. Vidljiva DNA nakon dodavanja izopropanola (foto original; T. Platz)

Slika 6. Pipetiranje uzorka u jažice agaroznog gela (foto original; T. Platz)

Slika 7. Elektroforeza produkata PCR reakcije (foto original; T. Platz)

Slika 8. G:Box uređaj za snimanje gela nakon elektroforeze(foto original; T. Platz)

Slika 9. Identifikacija alela *Ppd-D1* lokusa kod hrvatskih sorata pšenice, uzorci 1 – 16

(foto original; T. Platz)

## **12. Popis grafikona**

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

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

Diplomski rad

## Varijabilnost *Ppd* gena hrvatskih sorata ozime pšenice

Tajana Platz

### Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati alelnu varijabilnost *Ppd-D1* lokusa za reakciju na duljinu dana u 20 hrvatskih ozimih pšenica pomoću specifičnih mikrosatelitnih početnica, te rezultate usporediti s datumom klasanja u poljskim pokusima. Identificirane su dvije različite alelne varijante na *Ppd-D1* lokusu: *Ppd-D1a* od 288bp i *Ppd-D1b* od 414 bp. Alelna varijanta *Ppd-D1a* bio je prisutan u 18 od 20 (90%) sorata uključenih u istraživanje, što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima. Alelna varijanta *Ppd-D1b* detektirana je u samo jednoj sorti, sorti Dea. Obje alelne varijante, *Ppd-D1a* i *Ppd-D1b*, pronađene su u sorti Barbara što ukazuje na heterozigotnost ove sorte na ispitivano svojstvo. Rezultati dobiveni uspoređivanjem datuma klasanja i prisutnosti *Ppd-D1a*, odnosno *Ppd-D1b* alela su nedosljedni, što je najvjerojatnije rezultat ekstremnih klimatskih uvjeta tijekom vegetacijske godine 2013./2014..

**Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku**

**Mentor:** doc. dr. sc. Sonja Petrović

**Broj stranica:** 43

**Broj grafikona i slika:** 10

**Broj tablica:** 9

**Broj literaturnih navoda:** 35

**Broj priloga:**

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** pšenica, *Ppd* geni, datum klasanja

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Sonja Marić, predsjednik

2. doc. dr. sc. Sonja Petrović, mentor

3. prof. dr. sc. Vlado Guberac, 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**  
**Faculty of Agriculture in Osijek**  
**University Graduate Studies, Plant breeding and seed science**

**Graduate thesis**

## **Variability of *Ppd* genes in Croatian winter wheats**

**Tajana Platz**

### **Abstract:**

The aim of this study was to determine the variability of Ppd-D1 locus for photoperiod response in 20 Croatian winter wheat varieties using specific microsatellite primers and to compare the results with heading date wheat heading date obtained from field trial. Two different alleles were determined on Ppd-D1 locus Ppd-D1a from 288bp and Ppd-D1b from 414 bp. Among 20 cultivars, 18 (90%) carried photoperiod-insensitive allele Ppd-D1a. One cultivar, Dea, carried photoperiod-sensitive Ppd-D1b allele. Both photoperiod-insensitive and photoperiod-sensitive alleles were found in cultivar Barbara, what suggests that this cultivar is heterozygous for this trait. When comparing heading date and Ppd-D1a and Ppd-D1b allele distribution, results of this study were inconclusive, most likely because extreme climate conditions during vegetation season 2013/2014.

**Thesis performed at:** Faculty of Agriculture in Osijek

**Mentor:** doc. dr. sc. Sonja Petrović

**Number of pages:** 43

**Number of figures:** 10

**Number of tables:** 9

**Number of references:** 35

**Number of appendices:**

**Original in:** Croatian

**Key words:** wheat, , *Ppd* genes, heading date

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

1. prof. dr. sc. Sonja Marić chairman
2. doc. dr. sc. Sonja Petrović, mentor
3. prof. dr. sc. Vlado Guberac, member

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