

UDK: 633.11
Originalni naučni rad

ANALIZA ODRŽANJA GENETIČKOG IDENTITETA ELEKTROFOREZOM PROTEINA PRI SORTNOJ REPRODUKCIJI PŠENICE

*N. Đurić, S. Prodanović, N. Hristov, G. Cvijanović, M. Matković, V. Đekić**

Izvod: Primenom pozitivne i negativne selekcije, na nivou fenotipa pri sortnoj reprodukciji pšenice, u oglecima omogućila sortnu čistoću od 99 i 100% u usevima svih semenskih kategorija.

Elektroforeza proteina je pokazala da postoji divergentnost između ispitivanih sorti pšenice po sastavu komponenti glijadinske frakcije, odnosno da se gelovi sorti međusobno razlikuju po karakteristikama traka, dok unutar sorti postoji ujednačenost.

Način na koji se sprovodi selekcija i semenarstvo u Institutu PKB Agroekonomik je uspešan za održavanje genetičkog identiteta sorti pšenice, odnosno Institut PKB Agroekonomik je ovladao metodama proizvodnje semenskih useva koji omogućavaju dobijanje semena odličnog kvaliteta, visoke genetske čistoće.

Ključne reči: pšenica, sorte, genetički identitet, elektroforeza proteina, semenarstvo, kategorije semena.

Uvod

Sortna identičnost ispitivanih tri sorte pšenice ocenjivana je primenom vertikalne elektroforeze rezervnih proteina pšenice-glijadina. Vertikalna elektroforeza predstavlja laboratorijsku metodu kojom se prati kretanje koloidnih čestica u gelu pod uticajem električnog polja, kroz rastvor slabog elektrolita. Šema dobijenih proteinskih traka naziva se elektroforegram i predstavlja genetičku karakteristiku datog genotipa, koja se odnosi na genetičku konstituciju i smatra se „otiskom“ varijeteta.

Svaka ispitivana sorta pšenice ima specifične trake tj. komponente frakcija proteina. Trake se razlikuju po broju, obojenosti i pokretljivosti. Ispitivan je uzorak semena svake sorte u svakoj semenskoj kategoriji. Ova analiza imala je za cilj da pokaže da li se pri sortnoj reprodukciji pšenice uspešno održava genetički identitet sorti ili dolazi do gubljenja genetičkog identiteta usled ne odgovarajuće selekcije, slabe organizovanosti semenarstva, mešanja semena i dr.

Brojni istraživači su se bavili ocenom genetičkog identiteta kod pšenice, sa teorijskog ili praktičnog aspekta. Koristili su različite metode, kao što su fenotipska ocena po deskriptoru, elektroforeza i primena molekularnih markera. Huffman (2004.) je proučavanjem genetičkog identiteta kod genetički modifikovanih (GM) biljaka, dobio da se pri gajenju pšenice pojavljuju tri rizika vezana za promenu genetičkog identiteta: pojava zaostalih biljaka iz predhodnog useva, polenski drift odnosno rasipanje polena drugih biljaka, mešanje semena različitih sorti pri „on farm“ manipulaciji. Dong et al. (2005) ističu da su metode DNA finger printinga i AFLP analize pogodne za proučavanje genetičkog identiteta kod pšenice i načina nasleđivanja njenih osobina. Schuster et al. (2009) dobili su genetičke distance primenom mikrosatelitskih markera od 0,10-0,88 između 36 sorti preporučenih za različite regione Brazila. Zaključili su da se mikrosatelitski markeri mogu koristiti za zaštitu intelektualnih prava i za programe oplemenjivanja pšenice. Ruiz et al. (2002.) dobili su analizom glijadina da dolazi do kvalitativnih promena genetičke varijabilnosti španskih germplazmi pšenice tokom godina, odnosno tokom održavanja sorti. Za 35 godina 75% analiziranih uzoraka sačuvalo je genetički identitet.

*DrNenadĐurić, docent, drGoricaCvijanović, red.prof.,MirelaMatković, asistent, Fakultetzabiofarming, BačkaTopola, drSlavenProdanović, red.prof., PoljoprivrednifakultetZemun, dr Nikola Hristov, naučnisavetnik, Institutzaratarstvoipovrtarstvo, Novi Sad, dr Vera Đekić, naučnisaradnik, Centarzastrnažita, Kragijevac.

Materijal i metod rada

Kao materijal rada korišćene su tri divergentne sorte pšenice, Instituta PKB Agroekonomik (PKB Talas, BG Merkur i PKB Lepoklasa), ispitivane tokom dve proizvodne godine 2009 i 2010. godine. Ispitivana su po tri tretmana za svaku od ovih sorti u pogledu primene selekcije i gustine useva, koji odgovaraju zahtevima za proizvodnju tri različite kategorije semena: predosnovno seme, osnovno seme i seme C1 sortne reprodukcije.

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

U ovom radu uzimani su uzorci od po 100 zrna. Svako zrno je posebno analizirano, odnosno glijadinski proteini svakog zrna ispitani su u zasebnim kolonama na gelu. Određeno je da li se i koliko komponente glijadinske frakcije proteina u tri ispitivane varijante jedne sorte razlikuju, odnosno utvrđena je promena procenta genetičke identičnosti sorte u različitim kategorijama semenskog useva. Rezervni proteini glijadina iz ispitivanih uzoraka pšenice ekstrahovani su iz 100 pojedinačnih semena i razdvojeni na PAGH pH 3.2. Ukupno je napravljeno tri gela po uzorku. Vertikalna elektroforeza je urađena na opremi MAXX FILL, Carl Roth. Puferi za gel bili su 20 ml glacijalne sirćetne kiseline + jedan gram glycina, koji su dopunjeni destilovanom vodom do jedan litar i čuvani na hladnom mestu. Puferi za kadicu bili su 4 ml gacijalne sirćetne kiseline + 0,4 g glycina, koji su dopunjeni destilovanom vodom do jedan litar i čuvani na hladnom mestu.

Priprema uzoraka za analizu sastojala se u usitnjavanju zrna pšenice, prebacivanju u ependorficu od 1,5 ml, uz dodatak 300 µl ekstrakcionog rastvora (Methyl green – 0,05% u 25% 2-chloroethanolu), nakon mešanja uzorak je ostavljen na sobnoj temperaturi 12 časova. Sledeći dan je izvršeno centrifugiranje na 12400 rpm pet minuta i odvojen je supernatant, naneto je 12 µl supernatanta u bunarčić gela za elektroforezu. Postupak pravljenja gela obuhvatao je sledeće: čiste i suve staklene ploče su postavljane u svoje ležište za pravljenje gela, na gornju površinu stavljen je „češalj“ za pravljenje udubljenja za uzorke u gelu, a zatim je u 60 ml pufera za gel dodato 15 g akrilamida (12,5% gel), 0,5 g bis-akrilamida, 7,2 g uree, 0,12 g askorbinske kiseline i 0,006 g ferosulfata. Nakon mešanja i dopune puferom za gel do 120 ml izvršeno je hlađenje pet minuta u zamrzivaču. Dodato je 120 µl sveže pripremljenog 10% amonijumpersulfata i 420 µl TEMED-a. Nakon mešanja izvršeno je brzo sipanje između stakala unapred pripremljenog kalupa za gel. Posle 50 minuta polimerizacije, izvađeni su češljevi i kalup je prebačen u kadicu za elektroforezu. U svaki „bunarčić“ gela dodato je po 12 µl ekstrakta iz pojedinačnih zrna pšenice. Elektroforeza je obavljena pri konstantnom naponu struje od 300 V, uz neprekidno hlađenje, na temperaturi od 15-20^o C, u trajanju od četiri časa.

Po završetku elektroforeze gelovi su bojani i tokom noći ostavljeni potopljeni u boju: 1% PAGE blu G 90 u etanolu (10 ml) + 10% trihlorsirćetna kiselina (200 ml).

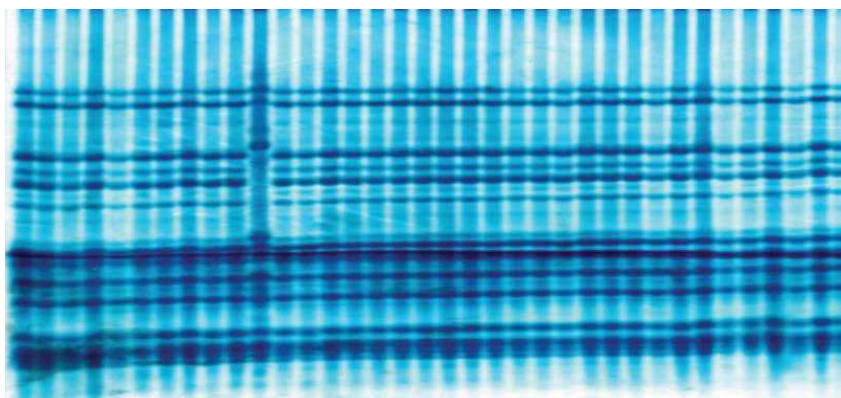
Obezbojavanje je izvršeno msa 10% trihlorsirćetnom kiselinom u trajanju od 30 minuta, a zatim destilovanom vodom. Gelovi su zatim skenirani i sačuvani kao jpg fajlovi. Elektroforeza je urađena u akreditovanoj laboratoriji Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu.

Rezultati istraživanja i diskusija

Na osnovu dobijenih rezultata, odnosno očitavanja gelova dobijenih metodom vertikalne elektroforeze utvrđeno je da postoji divergentnost između sorti po sastavu proteina, odnosno da se gelovi sorti međusobno razlikuju po karakteristikama traka, dok unutar sorti postoji ujednačenost.

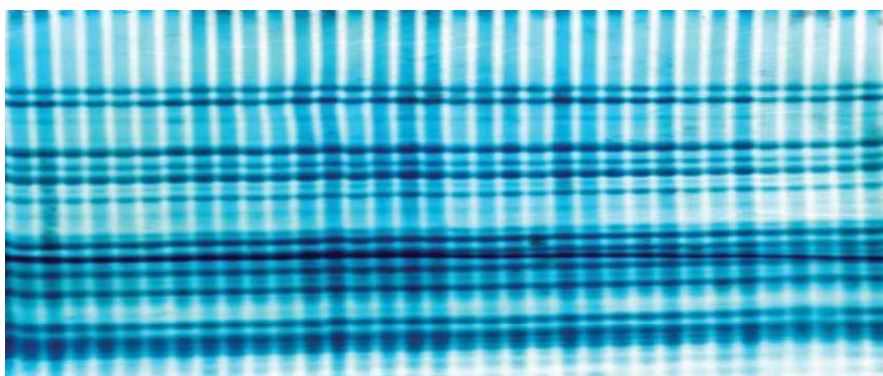
Na slikama 1,2 i 3 prikazani su elektroforegrami za sortu PKB Talas, za kategorije semena: predosnovno, osnovno i C1 seme. Na osnovu elektroforegrama može konstatovati da je sorta PKB Talas za kategoriju semena predosnovno seme (slika 1) od 100 ispitivanih zrna imala uniformnost 99. Jedno zrno je bilo različito, što znači da je genetička čistoća iznosila 99,0%. Sorta PKB Talas za kategoriju semena osnovno (slika 2) i C1 seme (slika 3)

bila je potpuno uniformna. Sve trake su bile istih karakteristika, te se može konstatovati da je genetička čistoća ispitivanih uzoraka iznosila 100%.



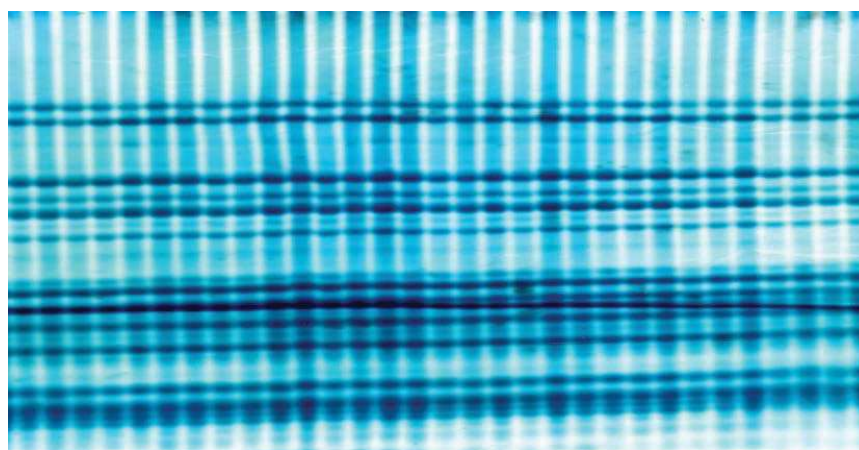
Slika 1. Elektroforegram gliadina iz individualnih semena sorte PKB Talas, kategorija semena: predosnovno seme

Fig. 1. *electrophoregrams gliadin from individual seed varieties PKB Talas seed category: pre-basic seed*



Slika 2. Elektroforegram gliadina iz individualnih semena sorte PKB Talas, kategorija semena: osnovno seme

Fig. 2. *electrophoregrams gliadin from individual seed varieties PKB Talas, star seed: basic seed*

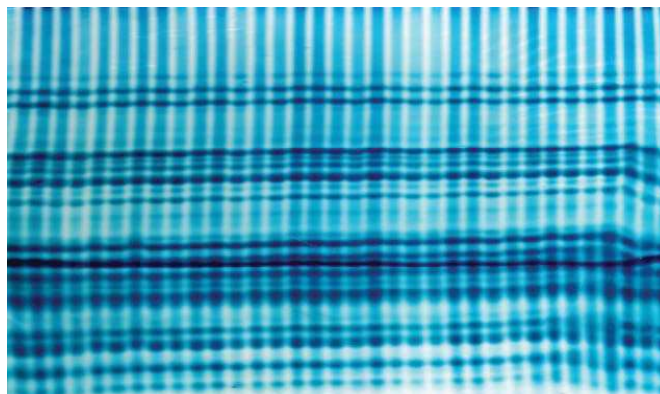


Slika 3. Elektroforegram gliadina iz individualnih semena sorte PKB Talas, kategorija semena: C1 seme

Fig. 3. *electrophoregrams gliadin from individual seed varieties PKB Talas, star seed: seed C1*

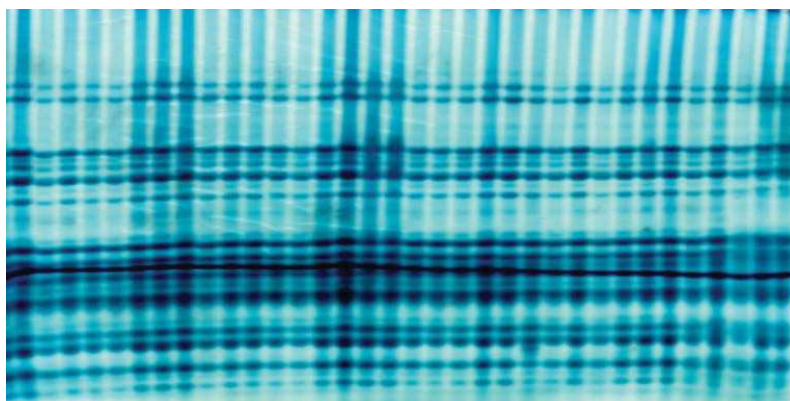
Elektroforegrami na slikama 4,5 i 6 prikazuju glijadinske komponente-trake iz semena sorte BG Merkur, u semenskim kategorijama: predosnovno, osnovno i C1 seme.

Uočava se da postoji uniformnost i genetička čistoća od 100% za kategorije semena: predosnovno i osnovno seme, dok je za kategoriju semena C1 seme, jedno zrno dalo različite trake, te genetička čistoća ove kategorije semena iznosi 99,0%.



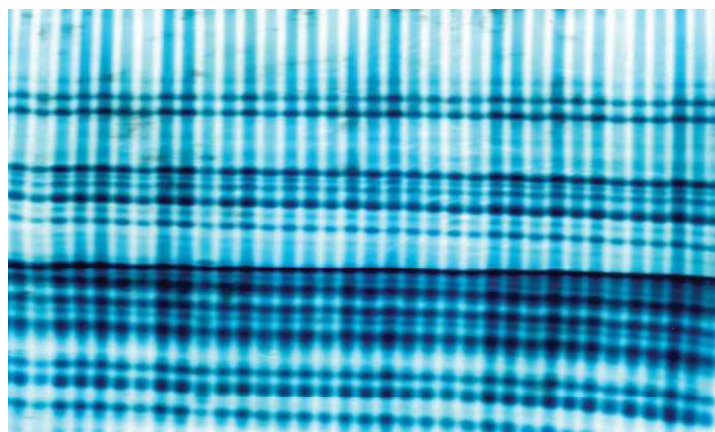
Slika 4. Elektroforegram glijadina iz individualnih semena sorte BG Merkur, kategorija semena: predosnovno seme

Fig.4. *electrophoregrams gliadin from individual seed varieties BG Merkur seed category: pre-basic seed*



Slika 5. Elektroforegram glijadina iz individualnih semena sorte BG Merkur, kategorija semena: osnovno seme

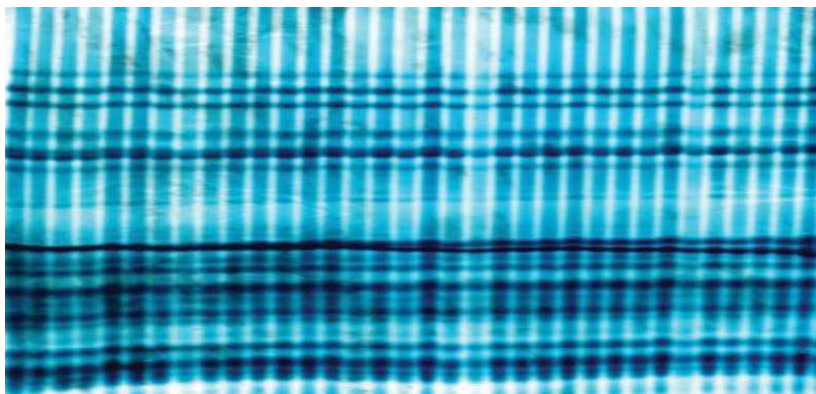
Fig. 5. *electrophoregrams gliadin from individual seed varieties BG Merkur, star seed: basic seed*



Slika 6. Elektroforegram glijadina iz individualnih semena sorte BG Merkur, kategorija semena: C1 seme

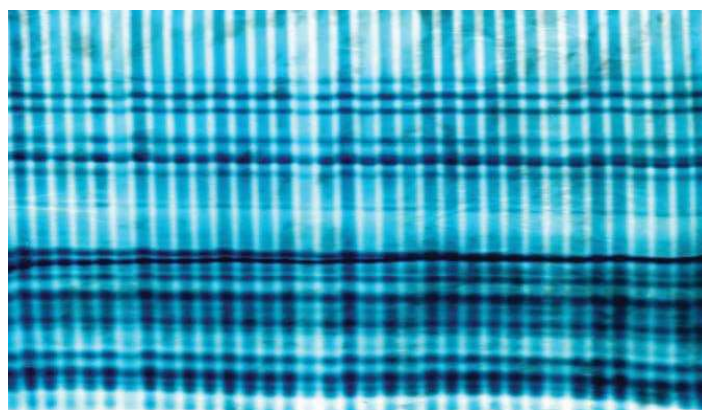
Fig.6. *electrophoregrams gliadin from individual seed varieties BG Merkur, star seed: seed C1*

Nakon izvršene elektroforeze i ispitivanja uzoraka semena sorte PKB Lepoklasa utvrđena je genetička čistoća 100% za sve tri ispitivane kategorije semena, što se može sagledati na slikama 7,8 i 9.



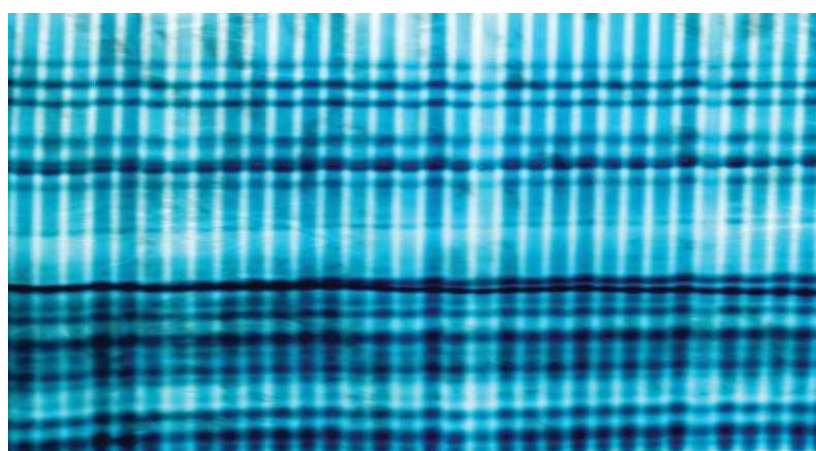
Slika 7. Elektroforegram glijadina iz individualnih semena sorte PKB Lepoklasa, kategorija semena: predosnovno seme

Fig.7. electrophoregrams gliadin from individual seed varieties PKB Lepoklasa seed category: pre-basic seed



Slika 8. Elektroforegram glijadina iz individualnih semena sorte PKB Lepoklasa, kategorija semena: osnovno seme

Fig.8. electrophoregrams gliadin from individual seed varieties PKB Lepoklasa, star seed: basic seed



Slika 9. Elektroforegram glijadina iz individualnih semena sorte PKB Lepoklasa, kategorija semena: C1 seme

Fig.9. electrophoregrams gliadin from individual seed varieties PKB Lepoklasa, star seed: seed C1

Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti, da je primenom pozitivne i negativne selekcije, na nivou fenotipa pri sortnoj reprodukciji pšenice, u ogledima omogućila sortnu čistoću od 99 i 100% u usevima svih semenskih kategorija.

- Elektroforeza proteina je pokazala da postoji divergentnost između ispitivanih sorti pšenice po sastavu komponenti glijadinske frakcije, odnosno da se gelovi sorti međusobno razlikuju po karakteristikama traka, dok unutar sorti postoji ujednačenost.
- Način na koji se sprovodi selekcija i semenarstvo u Institutu PKB Agroekonomik je uspešan za održavanje genetičkog identiteta sorti pšenice, odnosno Institut PKB Agroekonomik je ovladao metodama proizvodnje semenskih useva koji omogućavaju dobijanje semena odličnog kvaliteta, pune genetske čistoće.

Literatura

1. Dong, Y.Z., Liu, Z.L., Shan, X.H., Qiu, T., HE, M.Y., Liu, B. (2005): Allopolyploidy in wheat induces rapid and heritable alterations in DNA methylation patterns of cellular genes and mobile elements. *Russ. J. Genet.* 41: 890-896.
2. Đurić, N.(2013): Fenotipske promene i održanje genetičkog identiteta pri sortnoj reprodukciji pšenice. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
3. Huffman, W.E.(2004): Production, Identity Preservation, and Labeling in a Marketplace with Genetically Modified and Non-Genetically Modified Foods. *Plant Physiology*, 134/1, 3-10.
4. Ruiz, M., Rodriguez-Quijano, M., Metakovsky, E. V., Vazquez, J.F., Carrillo, H.(2002): Polymorphism, variation and genetic identity of Spanish common wheat germplasm based on gliadin alleles. *Field Crops Research*, 79/2, 185-196.
5. Schuster, I., Vieria, E.S.N., DA Silva, G.J., DE Assis Franko, F., Marchioro, V.S. (2009): Genetic variability in Brazilian wheat cultivars assessed by microsatellite markers. *Genet. Mol. Biol.* 32/3, 557-563.

UDC: 633.11
Original scientific paper

ANALYSIS OF CONSERVATION OF GENETIC IDENTITY BY PROTEIN ELECTROPHORESIS IN WHEAT REPRODUCTION

*N. Đurić, S. Prodanović, N. Hristov, G. Cvijanović, M. Matković, V. Đekić**

Summary

Application of positive and negative selection at the phenotype level in the reproduction of wheat varieties, enabled varietal purity of 99 and 100 % of the crops of seed categories.

Protein electrophoresis showed that there is a divergence between the tested wheat varieties in composition components gliadin fraction, respectively gels varieties differ in the characteristics of the tape, while inside there are varieties of uniformity.

Institute PKB Agroekonomik has been successful in maintaining the genetic identity of wheat variety in way it conducts selection and seed production. In that way, Institute PKB Agroekonomik is able to product seeds of excellent quality and high genetic purity.

Key words: wheat, varieties, genetic identity, protein electrophoresis, seed production, seed category.

*NenadĐurić, Ph.D., professor assistant, GoricaCvijanović, Ph.D.,full professor, MirelaMatković, professor assistant, Faculty for biofarming,BačkaTopola;SlavenProdanović, Ph.D., full professor, Faculty of agriculture, Zemun, Nikola Hristov, Ph.D., principal research fellow, Institute of Field and vegetable crops, Novi Sad, Vera Đekić, Ph.D., principal research fellow, Center for small grains, Kragujevac.