

*Spela Trpin, Branka Javornik, Ivan Kreft*  
*Biotehniška fakulteta — Ljubljana*

ELEKTROFORETSKA ANALIZA GLIADINA UZORAKA  
DOMAĆIH POPULACIJA PŠENICE SA RAZLIČITIM  
STEPENOM PLOIDNOSTI

UVOD

Zbog sve veće intenzifikacije gajenja broj različitih genotipova, koje u poljoprivredi proizvodimo, veoma se smanjio. Ograničeno je samo na nekoliko veoma jakih intenzivnih sorata, koje su kod biljaka, kao što je pšenica, zbog samooprašivanja, genetski izjednačene.

Suviše suženu genetsku varijabilnost moguće je ponovo povećati korišćenjem domaćih populacija pšenice, među kojima mogu biti i pšenice različitih stupnjeva ploidnosti.

Sakupljanje proučavanog materijala na području SR Crne Gore i susjednim oblastima Bosne i Hercegovine i očuvanje tog dragocenog genetskog materijala organizirao je akademik prof. dr Ljubo Pavićević u Poljoprivrednom institutu — Titograd. Morfologiju biljaka ovih pšenica opisao je Pavićević (1975), a neke preliminarne rezultate morfologije klasa i elektroforeza zrna Trpin i Javornik (1984). U ovom radu uključeni su rezultati elektroforetskih analiza ovog interesantnog autohtonog materijala.

Sa elektroforetskom analizom moguće je karakterizovati kultivare pšenice. Elektroforetski uzorak — elektroforegram — deo je fenotipa kultivara karakterističan za određen genotip i u primeru analize gliadina neovisan je od uslova njenog rasta (Lee i Roland, 1967, Wrigley, 1970. i drugi). Elektroforegram gliadina sastavljen je iz različitog broja elektroforetskih crta za pojedinačan kultivar — crte je moguće grupisati u šest grupa kod

heksaploidnih pšenica. Genetska istraživanja (Sozinov i Popereleva, 1980, Payne i saradnici, 1982. i drugi) pokazale su da svaki homeologi kromosom 1 i 6 sadržava vezane gene za gliadine (grupe elektroforetskih crta) i da je nasleđe gliadina kodominantno.

Kod istraživanog materijala interesovalo nas je kakve elektroforegramove imaju populacije pšenice posebno sa stanovišta heterogenosti (različitosti) unutar uzorka.

#### MATERIJAL I METOD RADA

Akademik dr Ljubo Pavićević je »Katedri za genetiку in žlahtnjenje rastlin«, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, ljubazno ustupio uzorke ubrane u Crnoj Gori i jugoistočnom dijelu Bosne.

Od ukupno 59 uzoraka rogosije i 11 uzoraka krupnika bilo je za elektroforetsku analizu odabranih 8 uzoraka rogosije i 11 uzoraka krupnika. Istraživani uzorci imali su sledeće oznake:

- broj 24 žutica sa žutim klasjem i osjem iz Majina
- broj 25 rogosija sa bijelim klasjem i mrkim osjem iz Brajića
- broj 32 rogosija sa smeđim klasjem i osjem iz Bojke — Ulcinj
- broj 38 rogosija sa smeđim osjem iz Police — Polimlje
- broj 43 rogosija sa crvenim klasjem i osjem iz Graba — Zubci
- broj 44 rogosija sa smeđim klasjem i osjem iz Podkraja — Zubci
- broj 46 rogosija sa smeđim klasjem i osjem iz Luga — Trebinje
- broj 57 rogosija sa bijelim osjem iz Fatnice — Stolac
- broj 41 krupnik jednozrnac iz Kosovog Luga — Danilovgrad
- broj 62 krupnik sa bijelim klasom iz Vranića — Nikšić
- broj 63 krupnik sa žutim klasjem i osjem iz Vranića — Nikšić
- broj 64 krupnik sa bijelim klasom iz Župe — Nikšić
- broj 65 krupnik — jednozrnac iz Luga — Trebinje
- broj 66 krupnik — dvozrnac iz Luga — Trebinje
- broj 68 krupnik — dvozrnac iz Otilovića — Pljevlja
- broj 69 krupnik — dvozrnac iz Šula, Crvena Stijena — Pljevlja
- broj 70 krupnik — dvozrnac sa crvnim klasjem iz Boljanića — Pljevlja
- broj 71 krupnik — dvozrnac sa crvnim klasjem iz Kule Fazlagića — Gacko
- broj 72 krupnik — dvozrnac sa bijelim klasom iz Kule Fazlagića — Gacko

Poslani materijal smo pored brojki obeležili i sa slovom »A«, a deo uzoraka smo odvojili i posijali u proleće 1983. godine na eksperimentalnom polju Biotehničkog fakulteta na Jamnikarjevoj ulici. Taj proizveden materijal smo označili sa slovom »B«.

Uzorci su bili već sa poimenovanjem podeljeni u dve grupe, na rogosije (24, 25, 32, 38, 43, 44, 46, 57) i krupnici (61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72). Primitili smo da su se rogosije pšenice slabo klijale i tako smo pri uzorcima broj 32, 43, 57 dobili samo po jedan klas proizvoda, a kod uzorka 49, klasna zrna su bila prazna. To je smetalo istraživanju genetske različitosti, jer njih ne možemo tražiti unutar iste biljke koja je pronikla iz samog jednog zrna.

Svuda, gde smo mogli, međusobno smo upoređivali materijal »A« i materijal »B«. Takođe smo proveravali i mogućnost promenljivosti unutar uzoraka.

Za elektroforetsko istraživanje gliadina upotrebili smo elektroforezu na 6% poliakrilamidnom gelu u Na-laktatnom pufru (pH=3.1) po metodu Bushuk i Zillman (1978) i Javornik (1983). Za ekstrakciju gliadina (u alkoholu topivih belančevina) upotrebili smo 70% etanol. Istraživali smo pojedinačna zrna unutar opisanih uzoraka pšenice.

#### REZULTATI I DISKUSIJA

Metod, koji smo upotrebljavali za proučavanje i upoznavanje naših uzoraka, je metod elektroforeze na poliakrilamidnom gelu. Dejstvo da ima isti genotip uvek jednak i elektroforegram (Lee i Ronalds, 1967), bez obzira na mesto i uslove u kojima raste, daje mogućnost proveravanja srodnosti u našem materijalu.

Ponovo smo proučavali promenljivost unutar uzoraka i među njima. Kod rogosija je ponovljivost unutar uzoraka prikazana u tab. 1. Sa slovom A su označeni ekstrakti zrna — njihovi elektroforegrami dobijeni iz poslanog dela uzoraka, a sa oznakom B su elektroforegrami jednakih, međutim kod kuće proizvedenih uzoraka. U slučaju da za slovom sledi brojka elektroforegram je deo druge elektroforeze, nego kad iza slova nema broja. Kod rogosija smo pojedina zrna u nekoliko slučajeva uzeli iz istog klasa i u svim tim slučajevima je po očekivanju elektroforegram između različitih ponavljanja jednak.

Razlike unutar uzoraka su ponekad dosta velike, a ponekad su veoma male. Svi uzorci pokazuju manji broj elektroforetskih crta na elektroforegramu, nego što ih ima heksaploidna pšenica — *Triticum aestivum* L.

Tab. 1. Shema ponovljivosti elektroforeograma kod rogosija

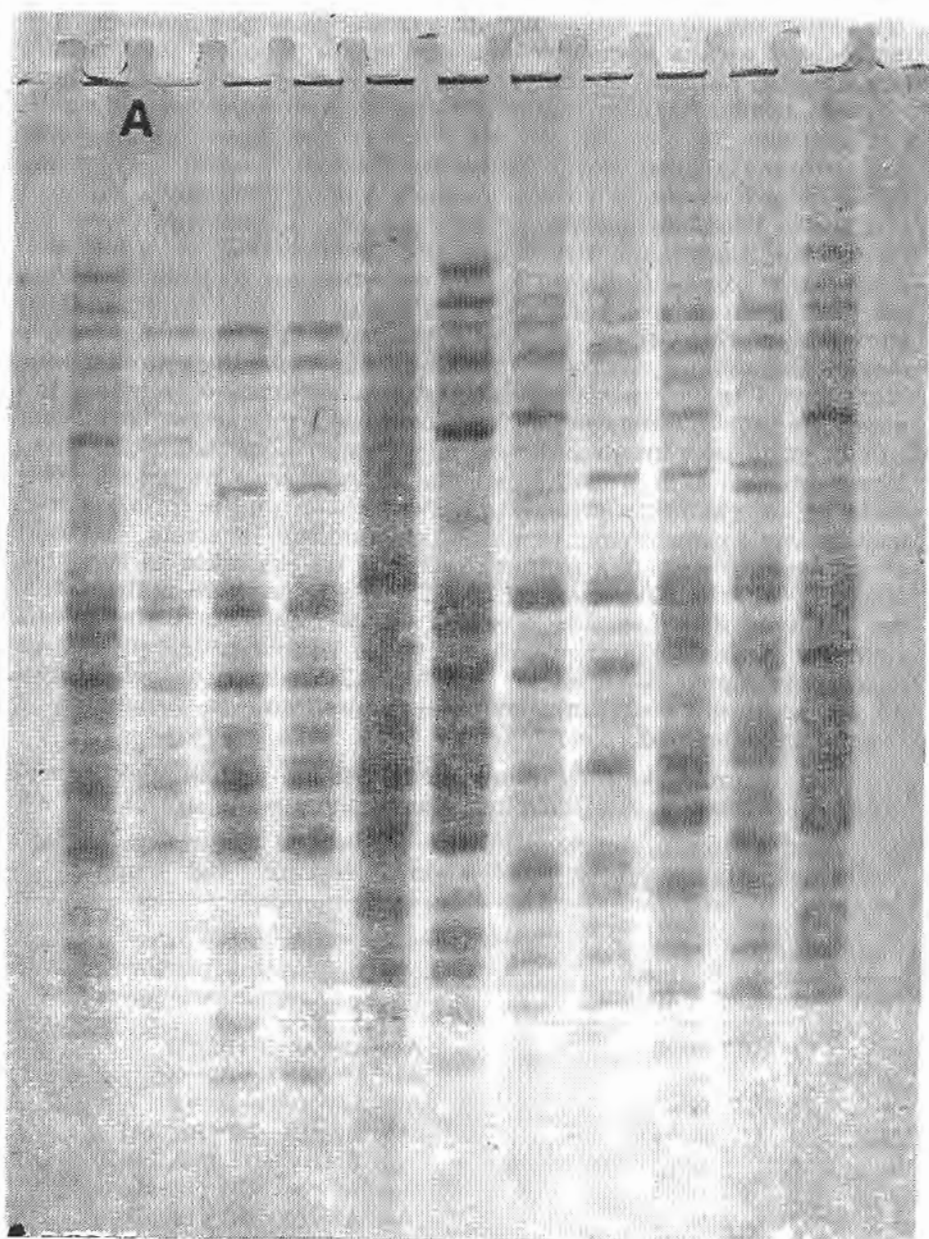
Broj uzorka	Broj različitih elektroforeograma	Ponovljivost	Formula ponovljivosti
46	1	6×	B1=B2=B=A1=A2=A
44	1	4×	B1=B2=B=A1=A2=A
43	2	4×	B1=B2=B=A1=A2=A
57	2	2×+2×	(A <sup>2</sup> =A) (A1=B=B1=B2)
32	2	3×+3×	(A1=A2=A) (B1=B2=B)
25	3	3×+2×+1×	(A1=B2=B1) (A=B) (A2)
24	4	2×+2×+1×+1×	(A1=A2) (B1=B2) (A) (B)
38	4	2×=2×+1×+1×	(A1=A2) (B1=B2) (A) B

Najmanji broj elektroforetskih belančevinastih crta je kod ekstrakta 57A, 57A2 (15+2); najveći broj kod uzorka 25 pri ekstraktima A, b (15+10). Pri tome znači prvi broj — 15 dobro vidljive crte, drugi — 10 znači slabije vidljive crte.

Znači najveći broj crta skoro je dupli u upoređenju sa najmanjim, što ukazuje na veliku heterogenost (različitost), uzoraka. Prosek dobro vidljivih crta je 16,3, ako uzmemo u obzir sve crte to iznosi 20,0.

Iako smo dobili dosta različitih elektroforeograma kod nekih primera su razlike unutar uzorka sa jednakim brojem veoma zanemarljive, a bitno se kod ostalih ekstraktova istog uzorka razlikuju: 25A2, 24A, 38A, 38B, 49B1, 49B2. Samo kod jednog uzorka (32) primetili smo da su elektroforegrami A1, A2, A između sebe jednaki i istovremeno različiti od elektroforeograma ekstrakta B, B1, B2 (a oni su među sobom isto tako jednaki). Slika B1 je kod svih uzoraka jednaka slici B2, A1 pa se od A2 istog uzorka razlikuje u dva slučaja. Kada smo upoređivali uzorke između sebe, ustanovili smo da je uzorak 44 (A, A1, A2, B, B1, B2) skoro uvek jednak uzorku 32 (ekstraktovima B1, B2, B) i 25A, B. Pri tome je zanimljivo da i pored toga, da je bila većina tvrdih pšenica ubrana na istom području (57, 46, 43, 38, 44) nismo primetili sličnosti elektroforeograma među tim uzorcima, već između 44 i 43 iz iste geografske grupe kao i među 25 i 32, koji rastu u drugim područjima.

Elektroforegramovi nekih rogosija (materijala »B«) prikazani su na fotografiji A. Kod uzoraka 32 prikazana su tri elektroforegrama, koji predstavljaju zrna triju biljaka. Biljka 32a ima različit elektroforegram od biljke 32c i 32e. Slično imaju različite elektroforegramove biljke 24a i 24e.



Fotografija A

Elektroforegrami gliadina rogosiya. Sa leve prema desno: 1, 6 i 11 standard «marques», 2, 3 i 4: rogosiya broj 32, biljka 32a, 32c, i 32e, 5: rogosiya broj 38, 7 i 8: rogosiya broj 24, biljke 24a i 24c, 9: rogosiya broj 34, 10: rogosiya broj 37.

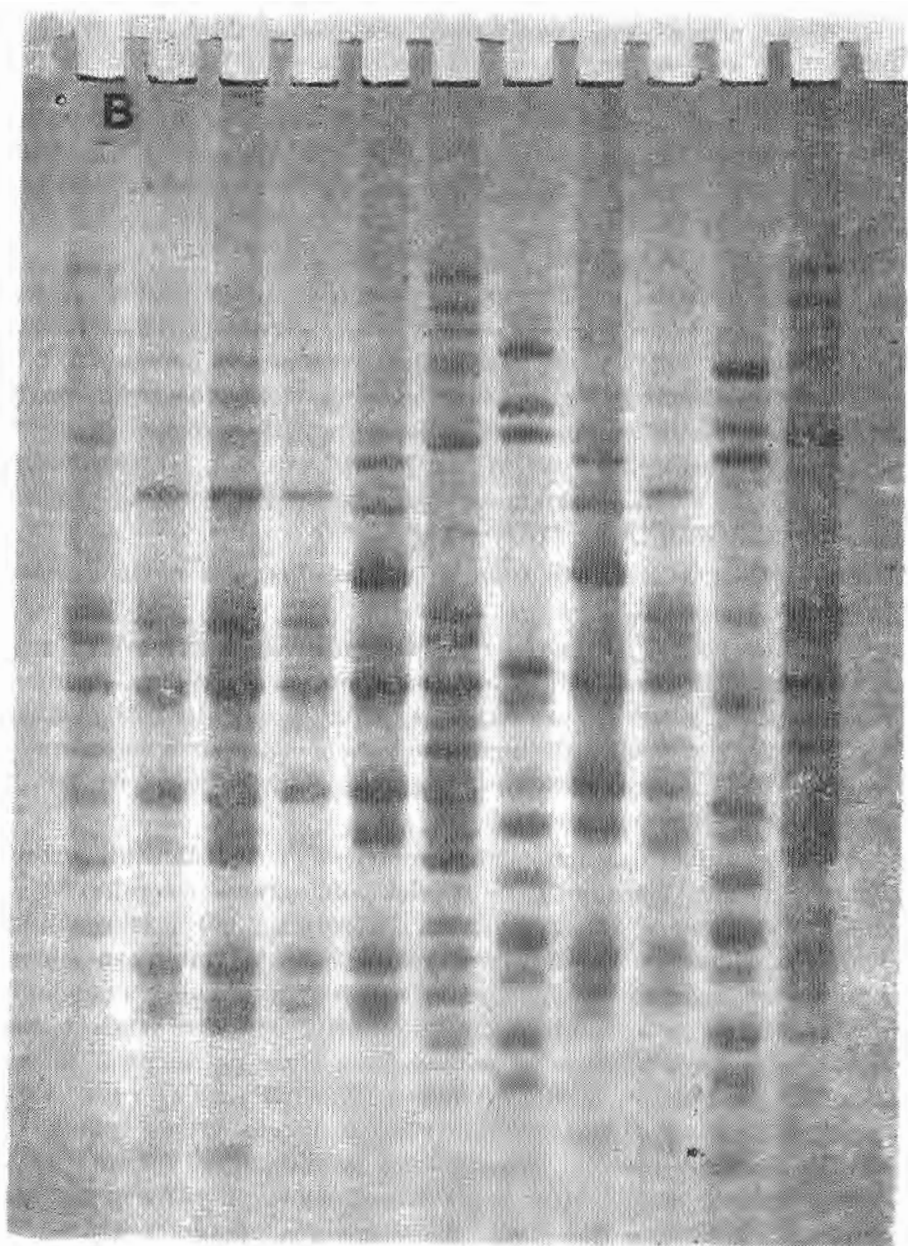
Interesantno je upoređivanje razlika elektroforeograma belančevina i razlika u morfološkim osobinama uzoraka. Tako se kod morfoloških osobina unutar uzorka menja boja zrna, oblik zrna i dužina brade. Razlike unutar poslatog dela uzoraka smo primetili kod uzoraka 24, 35, 32, 38, 46. Unutar, kod kuće proizvedenog dela uzoraka razlike nismo primetili. Različitoš elektroforeograma velika je pri uzorku 38 (četiri različita elektroforeograma), taj uzorak varira i po morfološkim znakovima. Isto tako uzorak 25 varira po elektroforeogramima (tri različita) i po morfološkim osobinama. Kod uzorka 32 su elektroforeogrami sa oznakom A jednaki, a isto tako su među sobom isti elektroforeogrami sa oznakom B, koji su istovremeno različiti od elektroforeograma sa oznakom A. Takode morfološke osobine variraju, međutim one se menjaju prema očekivanjima i unutar poslanog dela uzorka. Zanimljivo je iznenadno menjanje morfoloških osobina kod uzorka 46, gde se razlikuje boja i oblik zrna, iako imaju svih šest istraživanih klasa jednak elektroforeogram. Kod svih B ekstrakta, ima ekstrakt zrna B1 jednak elektroforeogram ekstraktu zrna B2, a istovremeno unutar proizvedenih uzoraka ne primećujemo razlike u morfološkim znacima. Ekstrakt sa oznakom B se u dva primera razlikuje od ekstrakta sa oznakom B1 i B2 (24, 38). Kod uzoraka 25 i 23, gde su vidljive razlike unutar poslanog dela uzoraka, očekivali bi variranje elektroforeograma i unutar A ekstrakta. Kod uzorka 25 to odgovara jer su sva tri elektroforeograma sa oznakom A, A1, A2 različiti, a pri uzorku 32 su suprotno očekivanju svi elektroforeogrami sa oznakama A između sebe jednaki ( $A=A1=A2$ ).

Od uzoraka, koji su imali među sobom jednak elektroforeogram su po morfološkim znacima veoma slični samo uzorci 43 i 44.

Kod krupnika prikaz ponovljivosti unutar uzoraka je sledeći:  
Tab. 2. Shema ponovljivosti elektroforeograma kod krupnika

Broj uzoraka	Broj različitih elektroforeograma	Ponovljivosti	Formula ponovljivosti
62	1	6x	$A1=A2=A=B=B2=B$
65	1	6x	$A1=A2=A=B=B2=B$
69	1	6x	$A1=A2=A=B=B2=B$
83	2	$5x+1x$	$(A1=A2=B1=B2=B)$ (A)
64	3	$4x+1x+1x$	$(A2=A=B=B1)$ (B2) (A1)
71	2	$3x+3x$	$(A1=A2=A)$ (B1=B2=B)
81	2	$3x+3x$	$(A1=A2=A)$ (B1=B2=B)
70	3	$3x+2x+1x$	$(A1=A2=B2)$ (A+B) (B1)
66	3	$2x+1x+1x$	$(A2=B1)$ (A1) (B)
72	3	$3x+2x+1x$	(B=A1) (A) (B2=B1=A2)
68	6	$1x+1x+1x+1x+1x+1x$	(A1) (A2) (A) (B1) (B2) (B)





Fotografija B

Elektroforegrami *gliadina krupnika*. Sa leve prema desno: 1. 6 i 11 standard »marques«, 2, 3 i 4: krupnik broj 70, biljke 70a, 70b i 70c, 5: krupnik broj 69, 7: krupnik broj 65, 8: krupnik broj 64, 9: krupnik broj 63 i 10: krupnik broj 6.

Ovde primećujemo manji broj ehлектроforetskih crta. Najmanji broj je kod uzorka 72 — kod ekstrakta A (8+1) i kod 68 (9), najveće je kod 72B1, B2, A2 (14+7). Zanimljivo je da kod istog uzorka 72 jedan poduzorak ima najmanji, dok pri drugom poduzorku ima najveći broj електроforetskih crta od svih proučavanih pšenica. Razlika je veća od faktora 2. Prosek електроforetskih belančevinastih crta je 15,2, ako uzmemo u obzir sve crte, a 11,4 ako uzmemo u obzir samo dobro vidljive crte.

Bitne razlike u електроforegramima su unutar istog uzorka samo kod uzoraka 61, gde su A i B uzorci veoma različiti. Takođe kod 72A bitno odstupa od ostalih електроforegrama uzorak 72. Bitne razlike su i unutar uzorka 68, gde su електроforegrami među sobom različiti. Kada smo upoređivali različite uzorke ustanovili smo sličnost među 69A1, A2, A, B1, B2, B i 64A2, A, B1, B te 70B1, 72B1, A2, B2 i 68B2. Takođe електроforegram 64B2 jednak je електроforegramu 72B, A1 i 71A1, A2, A1.

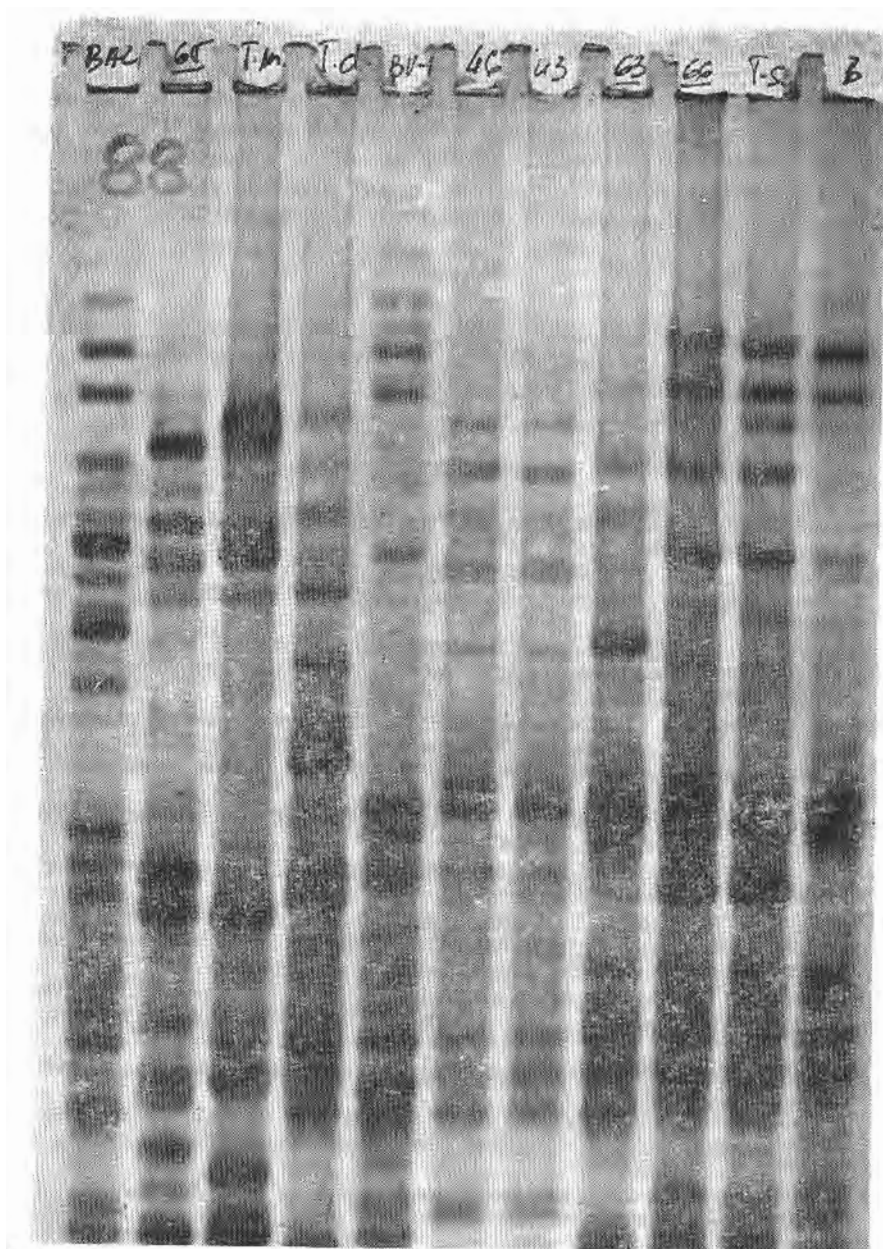
Na fotografiji B prikazani su електроforegrami nekih uzoraka krupnika (materijal »B«).

Interesantno je upoređenje promenljivosti morfoloških znakova i promenljivosti електроforegrama, jer primećujemo, da morfološki znaci u nekim primerima i pored promenljivosti електроforegrama ne variraju. Ako uporedimo morfološke znakove uzoraka, koji su imali jednake електроforegrame, konstatujemo da su po morfološkim znacima slični 69, 72, 68.

Upoređujući naš materijal sa materijalom iz botaničkih vrtova ustanovili smo izuzetno sličnost електроforegrama uzoraka 66 sa електроforegramom *Triticum spelta* (fotografija 88) i istovremeno izuzetnu sličnost u morfološkim znakovima. Još interesantnije je upoređenje uzoraka 65 i *Triticum monococcum*, kojeg smo dobili iz Botaničkog vrta u Ljubljani (fotografija 88). Pre svega je zanimljivo to da je upravo ta okolina Crne Gore po nekim autorima nalazište samonikle *Tritium monococcum* (Pavićević, 1975, Sears E. R., Feldman M., 1981). A u isto vreme znamo, da je baš on kod razvoja heksaploidne pšenice igrao važnu ulogu, jer je opisan kao davalac A genoma (Sears, Feldman, 1981, Caldwell, Kasarda 1981, Bowman i saradnici 1983). Pri istom uzorku 65 je pomoću brojanja kromosoma ustanovljeno da je u istinu diploidan.

Broj kromosoma bio je analiziran i kod uzoraka rogosije broj 46 i krupnika broj 63, gde je potvrđena tetraploidnost.





Fotografija 88

Elektroforegrami gladiina diploidne, tetraploidne i heksaploidne pšenice. Sa leve prema desno: 1: cv. »balkan« (6x), 2: krupnik broj 65, (2x) 3: T. monococcum (2x), 4: T. dicoccum (4x), 5: cv. »bačvanka-1« (6x), 6: rogosija broj 46 (4x.) 7: rogosija broj 43, 8: krupnik broj 63 (4x), 9: krupnik broj 66 (6x), 10: T. Spelta, 11: cv. »bačka« (6x).

Proučavani materijal je izuzetno raznolik. Raznolikost se pojavljuje među različitim uzorcima i takođe unutar njih. Iz elektrofograma možemo zaključiti dosta niži stepen ploidijske nego što je imaju intenzivno proizvedene heksaploidne pšenice. Upravo ova različitost može imati veliki značaj za dalje oplemenjivanje, jer bi unutar toliko različitih osobina, mogli sigurno otkriti nekoliko takvih, koje vredi preneti u intenzivno gajene kulture.

### Zahvala

Autori zahvaljuju akademiku dr Ljubu Pavičeviću za poslani materijal i sugestije i dr Blanki Drušković za izvršene analize hromosoma triju uzoraka pšenice.

### LITERATURA

- Beyles, B. E. in Clark J. A. (1954): Classification of wheat varieties grown in the United States in 1949, Tech. Bull. 1083: 173.
- Bowman, C. M., Bonnard, G. in Dyar, T. A. (1938): Chloroplast DNA variation between species of *Triticum* and *Aegilops* Theor. Appl. Gen. 65: 247-262.
- Bushuk, W. in Zillman, R. R. (1978): Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method, and nomenclature. Can. J. Plant Sci., 58: 508-511.
- Caldwell, K. A., in Kasarda, D. D. (1981): Assessment of genomic and species relationships in *Triticum* and *Aegilops* by PAGE and differential staining of seed albumins and globulins. Theor. Appl. Gen. 52: 273-280.
- Javornik, B. (1983): Uporaba elektroforeze gliadinov pri identifikaciji sort pšenice. Zb. BF, 41: 17-28.
- Lee, J. W. i Ronalds, J. A. (1967): Effect of environment on wheat gliadin. Nature 213: 844-846.
- Pavičević, Lj. (1975): Diploidne i tetraploidne pšenice u Crnoj Gori i susjednim oblastima; Acta Biologica — JAZU, Prirodoslovna istraživanja 40: 217-307.
- Payne, P. I., Holt, L. M., Lawrence, G. J. in Law, C. N. (1982): The genetics of gliadins and glutenins, the major storage proteins of wheat endosperm. Qual. Plant. Food Hum. Nutr. 31: 229-235.
- Sears, E. R. i Feldman, M. (1981): The wild gene resources of wheat. Sci. Am. 244: 102-111.
- Sozinov, A. A. in Popereleya, F. A. (1980): Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding. Ann. Technol. Agric. 29: 229-236.
- Trpin Š. i B. Javornik (1984): Morfološki opis in elektroforetska analiza gliadinov vzorcev domačih populacij pšenice (*Triticum* sp.) Zb.BF, 43: 25-35.
- Wrigley, C. W., Autran, J. C. and Bushuk, W. (1981): Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. Adv. in Cereal Sci. and Tech. 5: 211-259.
- Wrigley, C. W. (1970): Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis: Application to the study of genotypic variations in wheat gliadins. Biochem. Genet. 4: 509-515.