

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA**  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Sunčica Guberac, apsolvant

Diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

**1B/1R TRANSLOKACIJA U HRVATSKOM SORTIMENTU OZIME PŠENICE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2014.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Sunčica Guberac, absolvent

Diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

**1B/1R TRANSLOKACIJA U HRVATSKOM SORTIMENTU OZIME PŠENICE**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskoga rada:

1. prof. dr. sc. Milutin Bede, predsjednik
2. prof. dr. sc. Sonja Marić, mentor
3. doc. dr. sc. Sonja Petrović, član

**Osijek, 2014.**

## Sadržaj:

1. Uvod	1
1.1. Cilj istraživanja	2
2. Pregled literature	3
2.1. Utjecaj translokacije na agronomska svojstva pšenice	3
2.2. Metode identifikacije translokacije	10
3. Materijal i metode	14
3.1. Biljni materijal	14
3.2. Laboratorijski pokus	16
3.2.1. Uzgoj klijanaca	16
3.2.2. Izolacija genomske DNA	17
3.2.3. Provjera čistoće i koncentracije DNA	19
3.2.4. PCR analiza	21
3.2.5. Elektroforeza	25
3.2.6. Očitavanje rezultata	27
4. Rezultati	28
5. Rasprava	32
6. Zaključak	36
7. Popis literature	37
8. Sažetak	47
9. Summary	48
10. Popis tablica	49
11. Popis slika	50
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	51
BASIC DOCUMENTATION CARD	52

## 1. Uvod

Pšenica (*Triticum spp.*) je jedna od najvažnijih kultura za prehranu stanovništva te se uzgaja u gotovo svim dijelovima svijeta. Prvenstveno se uzgaja radi zrna, koje se koristi za proizvodnju brašna, kruha, tjestenine, ulja, piva, biogoriva itd. Koristi se u različitim industrijama kao što su mlinarska, konditorska, pivarska, farmaceutska, papirna i dr. Manji dio pšenice uzgaja se i za ishranu stoke. Pšenica ima značajnu ulogu u međunarodnoj trgovini te je od velike strateške važnosti (Martinčić i Kozumplik, 1996.). Prema FAO podacima za 2012. godinu pšenica je četvrta na ljestvici ukupne svjetske proizvodnje, nakon šećerne trske, kukuruza i riže, s ukupnom proizvodnjom od 670.875.110 tona te požnjevenom površinom od 215.489.485 ha. Na europskoj ljestvici ukupne proizvodnje pšenica zauzima prvo mjesto te je njena proizvodnja 2012. godine iznosila 195.824.091 tona uz požnjevenu površinu od 54.238.187 ha. Najveći svjetski proizvođači pšenice su Indija, Kina i SAD, dok su najveći europski proizvođači Francuska, Turska i Njemačka. Prema podacima iz 2012. godine ukupna proizvodnja pšenice u Hrvatskoj iznosila je 999.681 tona uz požnjevenu površinu od 186.949 ha i prosječni prinos od 5,34 t/ha (<http://faostat.fao.org>).

Poboljšanje prinosa i kvalitete, pored razvijanja otpornosti na biotski i abiotski stres, glavni je cilj oplemenjivača pšenice. Jedan od načina za povećanje genetske varijabilnosti, kao osnovne pretpostavke uspješnog oplemenjivanja, nađen je među ostalim i kroz iskorištavanje genoma raži (Riley i Kimber, 1966.). Raž (*Secale cereale* L.) ima veliki potencijal kao izvor gena poželjnih u oplemenjivanju pšenice. Posebno je zanimljiv kratki krak kromosoma 1R raži za kojega je utvrđeno da nosi mnoge poželjne gene za povećanje prinosa, efikasnije korištenje vode, otpornost na pojedine bolesti i štetnike kao i tolerantnost na različite stresne uvjete (McIntosh, 1983., Villareal, 1994., Mirzaghaderi i sur., 2011.). Translokacija kratkog kraka kromosoma 1R raži na mjesto dugog kraka kromosoma 1A, 1B ili 1D pšenice predstavlja praktično najzastupljenije unesene strane gene u genom heksaploidne pšenice (Denčić i sur., 2008.). Poznato je preko 16 različitih pšenica – raž translokacija među kojima je 1B/1R najviše korištena u oplemenjivanju pšenice (Friebe i sur., 1996.). Translokacija 1B/1R vuče podrijetlo od svega dva izvora, i to od raži „Petkus“ (2x) i od pšenoraži (*Triticale spp.*) (8x). Navedena translokacija je u kultivare pšenice širom svijeta uvedena korištenjem ruskih kultivara pšenice „Kavkaz“ i „Aurora“ u oplemenjivačkim programima (Schlegel i Korzun, 1997., Rabinovich, 1998.).

Vidljivo je da je genetska osnova 1B/1R translokacije u pšenici zapravo uska te će u budućnosti biti potrebno pronaći nove izvore translokacije za daljnji rad. Osim što joj se pripisuju navedena pozitivna svojstva translokaciju se povezuje i s lošom tehnološkom kvalitetom pšenice. Negativan utjecaj na tehnološku kvalitetu očituje se u vidu smanjene tolerantnosti tijesta pri miješanju, povećanju ljepljivosti tijesta i smanjenju volumena kruha, što je posljedica prisutnosti sekalina iz raži i zamjene glutenina i gliadina (Dhaliwal i MacRitchie, 1990., Martin i Carrillo, 1999.). Treba uzeti u obzir i činjenicu da se svojstva uvjetovana translociranim genima ne moraju pokazati stalnima u različitim genetskim pozadinama i okolišnim uvjetima (Ehdaie i sur., 2003.). Ipak, zbog svojih pozitivnih svojstava translokacija ima važnu ulogu u oplemenjivačkim programima te je iz praktičnih razloga potrebno razviti metode za njenu brzu i pouzdanu identifikaciju (Weng i sur., 2007.). Mali kromosomski segmenti raži, koji su najpoželjniji u oplemenjivanju pšenice, teško se mogu identificirati citološkim metodama. Zbog toga sve više raste zanimanje za molekularne markere kao sredstvo identifikacije navedenih translokacija u genomu pšenice (Iuoras i sur., 2006.).

### 1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi zastupljenost 1B/1R translokacije u hrvatskom sortimentu ozime pšenice korištenjem molekularnih markera.

## 2. Pregled literature

Spontanu translokaciju kratkog kraka kromosoma 1R raži na mjesto kratkog kraka kromosoma 1B pšenice, poznatu i kao 1BL/1RS translokacija, prvi puta spominje Kattermann (1937.). U prošlosti su oplemenjivači pšenice, pokušavajući poboljšati njena svojstva, nehotice prenijeli kromosom 1R raži u genom pšenice. Navedena translokacija prenešena je u brojne genotipove pšenice klasičnim križanjem, pri čemu je selekcija na otpornost na bolesti bez citološke kontrole utjecala na odabir upravo tih genotipova (Metin i sur., 1973.), stoga ne čudi da je navedena translokacija utvrđena u stotinama kultivara pšenice širom svijeta (Rabinovich, 1998.). Villareal i sur. (1998.) tako navode da na svjetskoj razini 1BL/1RS kultivari pšenice zauzimaju preko pet milijuna hektara obradive površine te da u pojedinim zemljama 90% posijane pšenice ima navedenu translokaciju. Također navode da 50% CIMMYT visoko prinostnih linija pšenice posjeduje navedenu translokaciju, među kojima je svakako najistaknutija grupa sestričkih linija „Veery“, od kojih su u Meksiku lansirane četiri – Glennson-81, Ures-81, Genaro-81 i Seri-82 (Merker, 1982.). 1BL/1RS translokacija najvećim je dijelom prenešena u heksaploidne pšenice - *Triticum aestivum* L., iako ima primjera uspješnog prijenosa i u tetraploidne pšenice - *Triticum turgidum* L. (Merker, 1982., Friebe i sur., 1987., 1989, Rabinovich, 1998.).

### 2.1. Utjecaj translokacije na agronomska svojstva pšenice

1BL/1RS translokacija od posebnog je značaja i koristi se u mnogim oplemenjivačkim programima, prvenstveno zbog prisutstva 1RS kromosoma za kojega je utvrđeno da nosi različite gene za otpornost. Kratki krak kromosoma 1R raži tako nosi gene za otpornost na lisnu hrđu (*Puccinia recondita* Rob. et. Desm. f. sp. *tritici*), stabljичnu hrđu (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. et Henn.), prugastu hrđu (*Puccinia striiformis* Westend f. sp. *tritici*) i pepelnicu (*Blumeria graminis* (DC.) EO Speer f. sp. *tritici* Em. Marcahal) (McIntosh, 1983.). Međutim, prema nekim izvorima, otpornost na pojedine patogene u nekim područjima je već prevladana, što ne začuđuje s obzirom na to da je genetska osnova 1BL/1RS translokacije prilično uska. Naime, većina 1BL/1RS kultivara nosi translokaciju podrijetlom od ruskih kultivara pšenice Aurora i Kavkaz, za koje je utvrđeno da su nastale spontanim intergenus križanjem, a koje su korištene u oplemenjivačkim programima širom svijeta (Metin i sur., 1973.). Rješenje problema tako bi mogao biti

pronalazak novih izvora varijabilnosti za različite otpornosti unutar genoma raži (Ren i sur., 2009.).

Friebe i sur. (1989.) uspoređivali su tetraploidne i heksaploidne 1B/1R translokacijske linije te su utvrdili da je gen *Pm8*, zaslužan za otpornost na pepelnicu, koji se nalazi na 1R kromosomu raži, izražen kod tetraploidnih, ali ne i kod heksaploidnih linija. Iz rezultata je zaključeno da postojanje navedene translokacije ne znači nužno i ekspresiju gena vezanog za nju.

Gene za otpornost na lisnu (*Lr26*), stabljичnu (*Sr31*) i prugastu hrđu (*Yr9*) te  $\omega$  - sekaline (*Sec1*), na kratkom kraku kromosoma 1R raži, mapirali su Singh i sur. (1990.). Geni za otpornost locirani su 5.4 +/- 1.7 cM od *Sec1* lokusa, koji je lociran 26.1 +/- 4.3 cM od centromere. Utvrđen je poredak gena od centromere *Sec1 – Lr26 – Sr31 – Yr9*. Iz rezultata je zaključeno da su veoma mali segmenti 1RS kromosoma potrebni kako bi se osigurala otpornost na sve tri hrđe, ali i da je teško razdvojiti gene za otpornost od gena za sekaline, a koji se povezuju s ljepljivošću tijesta.

Hsam i sur. (2000.) mapirali su gene za otpornost na pepelnicu i lisnu hrđu na kratkom kraku kromosoma 1R, translokacije 1BL/1RS, u odnosu na *Sec-1* lokus i AFLP i RFLP markere. Utvrđeno je da se gen za otpornost na pepelnicu *Pm17* nalazi između gena za otpornost na lisnu hrđu *Lr16* i *Sec-1* lokusa.

Mohler i sur. (2001.) razvili su STS marker iz RFLP probnog markera IAG95, koji razlikuje alele za otpornost na pepelnicu podrijetlom iz raži, na *Pm8* i *Pm17* lokusu krušne pšenice. Marker omogućava umnažanje DNA fragmenata različite dužine iz 1AL/1RS i 1BL/1RS linija s 1RS kromosomom podrijetlom od raži *Insave* i *Petkus*.

Molekularne markere na bazi PCR-a, koji su povezani s genima za otpornost na hrđu, a nalaze se na kratkom kraku kromosoma 1R raži *Petkus* (*Lr26*, *Sr31*, *Yr9*) i *Imperial* (*SrR*), identificirali su i mapirali Mago i sur. (2002.) korištenjem translokacijskih linija.

Anderson i sur. (2003.) mapirali su *Dn7*, gen lociran na kromosomu 1RS raži, koji uvjetuje otpornost na rusku lisnu uš pšenice. Navedeni gen je prenešen iz raži u pšenicu putem 1BL/1RS translokacije. Napravljena je genetska mapa sa šest markera povezanih s *Dn7* koji obuhvaćaju 28.2 cM. Bočni markeri gena *Dn7*, *Xbcd1434* i *XksuD14*, mapirani su 1.4 cM i 7.4 cM od *Dn7*. Također je utvrđeno da se radi o dominantnom genu te da se otpornost koju navedeni gen uvjetuje zasniva na principu antiksenoze.

Mago i sur. (2005.) navode da su prethodne studije pretpostavljale da je otpornost na stabljičnu, lisnu i prugastu hrđu uvjetovana blisko vezanim genima ili jednim genom koji prepoznaje sve tri vrste hrđe. Oni su u svome istraživanju korištenjem rekombinacija i mutacija utvrdili da su geni *Sr31*, *Lr26* i *Yr9*, odgovorni za navedene otpornosti, blisko vezani geni. Visoko – rezolucijskim mapiranjem i mutacijskim analizama razdvojili su *Sr31*, *Lr26* i *Yr9* gene na kratkom kraku kromosoma 1R raži. Za mapiranje im je poslužila F2 populacija nastala križanjem dviju 1BL/1RS translokacijskih linija, od kojih je jedna imala navedene gene, a druga ne.

Utjecaj 1BL/1RS translokacije na biološka svojstva pšenice ispitivali su Dimitrijević i sur. (2008.) na uzorku od 139 kultivara krušne pšenice. Uspoređivali su dvije grupe kultivara, one sa i one bez navedene translokacije. Utjecaj translokacije je promatran u različitim genetskim pozadinama s obzirom na sastav rezervnih proteina sjemena. Kultivari s navedenom translokacijom imali su veću tolerantnost na lisnu i stabljičnu hrđu, ali i manju tolerantnost na pepelnicu. Različita genetska pozadina u manjoj je mjeri utjecala na rezultate, koji su stoga pripisani utjecaju translokacije.

Luo i sur. (2008.) navode da je 1BL/1RS translokacija postala nepopularna budući da su geni za otpornost koji se nalaze na 1RS kromosomu raži postali neefektivni, a utjecaj na povećani prinos uočen je samo u pojedinim genetskim pozadinama. U svome istraživanju ispitivali su reakcije kultivara pšenice, s 1RS kromosomom iz L155 i R12 inbred linija raži, na rase CYR31 i CYR32 gljive *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. Kultivari pšenice Aurora i Benno, koji nose gen za otpornost *Yr9* lociran na 1BL/1RS translokaciji, a podrijetlom od raži Imperial, bili su visoko osjetljivi na navedene rase. Nasuprot njima kultivari pšenice s 1RS kromosomom iz L155 i R12 inbred linija raži bili su visoko otporni na navedene rase. Utvrđeno je da je otpornost uvjetovana dominantnim genima, *YrCN17* i *YrR212*, koji se nalaze na translociranom 1RS kromosomu.

Križanjem inbred linije raži L155 i nekoliko kultivara pšenice, Ren i sur. (2009.) razvili su novu 1BL/1RS translokacijsku liniju - R14. Novi geni za otpornost na prugastu hrđu i pepelnicu, locirani na kromosomu 1RS linije R14, imenovani su kao *YrCn17* i *PmCn17*. Gen *YrCn17* uvjetuje otpornost na *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* patotipove koji su otporni na *Yr9* gen, a gen *PmCn17* uvjetuje otpornost na *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* patotipove otporne na *Pm8* gen.



Tang i sur. (2008.) također navode da je stvoren novi kultivar pšenice CN18 koji posjeduje 1BL/1RS translokaciju, a odlikuje se visokim prinosom, otpornošću na pepelnicu i prugastu hrđu te predstavlja novi izvor 1RS translokacije u oplemenjivanju pšenice.

Iz dvostrukih translokacijskih linija, Rahmatov (2012.) je izolirao translokacijske linije otporne na rasu Ug99 gljive *Puccinia graminis*. Otporne linije bile su homozigotne za 1RS i heterozigotne za 2RL translokaciju. Linije su identificirane različitim metodama; fenotipskim markerom (boja koleoptile), Giemsa C-banding metodom i mikrosatelitnim markerima.

Osim što posjeduje gene za različite otpornosti, 1BL/1RS translokacija se povezuje i s povećanjem adaptabilnosti, tolerantnosti na stres, stabilnosti i visine prinosa pšenice (Rajaram i sur., 1983.). Međutim, pored navedenih pozitivnih, 1BL/1RS translokaciji se pripisuju i neki negativni učinci i to prvenstveno negativan učinak na tehnološku kvalitetu pšenice.

Količina i kvaliteta bjelančevina zrna ima važan utjecaj na tehnološka svojstva pšenice. Elastičnost i viskoznost tijesta u najvećoj je mjeri pod utjecajem glijadina i glutenina, rezervnih bjelančevina zrna i glavnih komponenata glutena. Količina i sastav glijadina i glutenina povezani su s reološkim svojstvima tijesta, volumenom i strukturom kruha. Generalno glijadini utječu na rastezljivosti, a glutenini na čvrstoću i elastičnost tijesta. Prema primarnoj strukturi, glijadini se dijele na  $\omega 5$ -,  $\omega 1,2$ -,  $\alpha$ - i  $\gamma$ - podskupine, a glutenini na visokomolekularne (HMW) i niskomolekularne (LMW) podjedinice. Na kratkom kraku homolognih kromosoma 1A, 1B i 1D pšenice nalaze se geni koji kontroliraju  $\omega$  i  $\gamma$  glijadine, a na dugom kraku geni koji kontroliraju HMW gluteninske podjedinice. Slično pšenici, na kratkom kraku kromosoma 1R raži nalaze se geni koji kontroliraju sekaline, a na dugom kraku geni koji kontroliraju gluteline. Smatra se da je upravo prisutnost sekalina iz raži, kao i smanjenje broja glutenskih lokusa, uzrok negativnog učinka 1BL/1RS translokacije na tehnološka svojstva pšenice (Moonen i Zeven, 1984., Dhaliwal i MacRitchie, 1990., Horvat i sur., 2006., Rukavina i sur., 2012.).

Dhaliwal i sur. (1987.) povratne križance tri komercijalne australske krušne pšenice, koje posjeduju 1B/1R translokaciju, uspoređivali su s njihovim rekurentnim roditeljima. Utvrdili su da 1B/1R translokacija generalno nema većih štetnih učinaka na masu 1000 zrna, specifičnu masu, proteine zrna i brašna, tvrdoću zrna, mlinarsku kvalitetu ili apsorpciju vode. Kod tvrdih pšenica translokacija je utjecala na smanjenje SDS

sedimentacijskog volumena i vremena razvoja tijesta. Kod mekih pšenica nije bilo dokaza da je 1B/1R translokacija značajno utjecala na smanjenje SDS sedimentacijskog volumena, vrijeme razvoja tijesta ili otpornost na rastezanje.

Utjecaj 1B/1R translokacije na potencijalni prinos pojedinih visokoprinosnih jarih pšenica ispitivali su Villareal i sur. (1991.), pri čemu nije bilo ograničavajućih faktora plodnosti i vlažnosti te su korišteni preventivni programi zaštite od bolesti i štetnika. Rezultati su pokazali da su 1B/1R linije imale povećani prinos nadzemne mase, broj klasova po metru kvadratnom, povećanu masu 1000 zrna, specifičnu masu kao i nešto veći prinos zrna. Usporedbom kultivara utvrđeno je da 1B/1R grupa dozrijeva kasnije nego 1B grupa.

Graybosch i sur. (1993.) uspoređivali su utjecaj 1AL/1RS i 1BL/1RS translokacije na kvalitetu brašna. SDS sedimentacijski volumen i tolerantnost pri miješanju bili su veći kod 1AL/1RS linija nego kod 1BL/1RS linija te su se linije s 1AL.RS translokacijom pokazale kao poželjniji odabir.

Utjecaj 1B/1R translokacije na agronomska svojstva jarih krušnih pšenica CIMMYT-a, ispitivali su Villareal i sur. (1994.). U ispitivanje su uključili pet genotipova sa i pet bez translokacije. Nije bilo ograničavajućih faktora na plodnost i vlažnost te su korišteni preventivni programi zaštite od bolesti i štetnika. Genotipovi s translokacijom imali su 2.2% viši prinos nadzemne mase, 2.1% više klasova po kvadratnom metru, 1.12 g veću masu 1000 zrna i 0.8 kg/ha veću specifičnu težinu. Genotipovi bez translokacije imali su 0.8 % veći žetveni indeks i 0.6 cm duže klasove. 1B/1R kultivari dozrijevali su 2.5 dana kasnije od 1B kultivara.

Burnett i sur. (1995.) ispitivali su utjecaj 1B/1R translokacije na svojstva i sastav zrna i brašna pšenice. Utvrđeno je da 1B/1R linije imaju veći sadržaj proteina u odnosu na njihove bliske 1B izolacije. Nije bilo značajne razlike u čvrstoći, Hagberg-ovu broju padanja i sadržaju pentozana. 1B/1R linije imale su statistički značajno niže SDS sedimentacijske vrijednosti. Nije bilo značajnih razlika u svojstvima mljevenja, miksografskim svojstvima i ljepljivosti tijesta.

Utjecaj 1B/1R translokacije na prinos zrna i njegove komponente ispitivali su Villareal i sur. (1998.). U ispitivanje su uključili 20 bliskih izolacija jare pšenice Seri M82, od kojih je 10 bilo homozigotno za 1B/1R translokaciju. Utvrđeno je da je prisutnost 1B/1R

translokacije utjecala na 1.6% veći prinos kod optimalnih uvjeta vlažnosti i na 11.3% veći prinos kod uvjeta smanjene vlažnosti.

Wieser i sur. (2000.) ispitivali su utjecaj 1B/1R translokacije na sastav glutena i tehnološka svojstva krušne pšenice. Austrijsku krušnu pšenicu Amadeus sa i bez translokacije zajedno s još tri genotipa s translokacijom, poznatog sastava HMW podjedinica, uzgojili su pod jednakim uvjetima. Sadržaj sirovih proteina, glutationa i cisteina u brašnu bio je pod neznatnim utjecajem translokacije. Sadržaj  $\omega$  1,2 – gliadina bio je značajno povećan, a sadržaj LMW podjedinica smanjen. Utjecaj translokacije na reološka svojstva tijesta i gluten očitovao se znatno smanjenim vremenom razvoja tijesta, smanjenim maksimumom otpornosti i povećanom rastezljivosti. Volumen kruha bio je smanjen za 10%. Sadržaj gluteninskih podjedinica bio je u većoj korelaciji sa vremenom razvoja tijesta, otpornošću tijesta i glutena i volumenom kruha nego sadržaj gliadina.

Interakciju alelne varijacije Glu-D1 lokusa i 1BL/1RS translokacije ispitivali su Martin i sur. (2001.). Razlika u srednjoj vrijednosti volumena SDSS-a između linija s HMW 5+10 podjedinicama i linija s HMW 2+12 podjedinicama bila je četiri puta niža kod linija bez 1BL/1RS translokacije, što ukazuje na značajnu interakciju Glu-D1 alela i 1BL/1RS translokacije. Utjecaj translokacije na svojstva miješanja tijesta ovisio je o genetskoj pozadini. Nije utvrđena značajna razlika u vremenu miješanja i tolerantnosti tijesta između linija sa i bez translokacije. Utvrđeno je da prisutnost HMW 2+12 podjedinica i 1BL/1RS translokacije utječe na drastičan pad snage glutena.

Lukaszewski (2001.) navodi da je 1BL/1RS kromosom stvoren induciranom homolognom rekombinacijom kako bi se otklonio negativan utjecaj navedene translokacije na pekarsku kvalitetu. Tako su stvorene dvije vrste “multipoint“ translociranih kromosoma, MA i Te, koji imaju Gli-B1 i Glu-B3 lokuse pšenice, a nemaju Sec-1 lokus raži.

Kumlay i sur. (2003.) navode da većina istraživanja ne može razdvojiti utjecaj translociranog kraka kromosoma raži od utjecaja odsutstva odgovarajućeg kraka kromosoma pšenice. Ispitivanjem različitih translokacijskih linija utvrdili su da je negativan efekat 1RS kromosoma na konačnu kvalitetu puno veći od utjecaja odsutstva odgovarajućeg 1S kromosoma pšenice. Također je uvrđeno da je 1AL/1RS translokacija poželjnija u pogledu konačne kvalitete, a 1BL/1RS poželjnija za agronomski učinak te je imala najviši utvrđeni prinos među ispitivanim translokacijama.

Utjecaj translociranog kratkog kraka kromosoma 1R raži Petkus, na proljetnu pšenicu Pavon, ispitivali su Ehdaie i sur. (2003.). Pavon i njene translokacije ispitivane su dvije godine u stakleniku i dvije godine u polju, u uvjetima dobre opskrbljenosti vodom i u sušnim uvjetima. Translokacija je utjecala na odgađanje zrelosti, reduciranu visinu biljke i povećanu biomasu korijena. Veza između biomase korijena i prinosa zrna bila je značajna i u uvjetima dobre opskrbljenosti vodom i u sušnim uvjetima. Translokacija je povećala prinos zrna i težinu zrna, posebice u uvjetima dobre opskrbljenosti vodom. Prinos zrna pšenice Pavon tako je iznosio 4.066 t/ha, a njene 1B/1R translokacije 4.503 t/ha. Translokacije su imale veću tolerantnost na stresne okolišne uvjete u odnosu na Pavon.

Kim i sur. (2004.) ispitivali su različite 1R supstitucijske, 1RS i 1RL translokacijske linije pšenice Pavon 76 i utvrdili da 1RS translokacija ima najpoželjniji agronomski učinak te da utječe na znatno povećanje prinosa. Prema njima glavni faktor nestalnog učinka 1RS translokacije je nejasan utjecaj genetske pozadine pšenice. Također navode da izvor kromatina raži ima veći utjecaj na agronomski učinak nego njegova sama pozicija u genomu pšenice.

Lelley i sur. (2004.) ispitivali su šest parova bliskih izogenih linija pšenice sa i bez 1BL/1RS translokacije podrijetlom iz Austrije i Mađarske. Uzgajali su ih u 11 različitim okolišnih uvjeta i ispitivali njihova agronomska i kvalitativna svojstva. Utvrdili su da je stabilnost prinosa bila slična i kod translociranih i netranslociranih linija. Navode i da je za okolišnu stabilnost važnija bila genetska pozadina pšenice nego prisutstvo translokacije.

Utjecaj alelne varijacije na Glu-1 i Glu-3 lokusu te utjecaj prisutstva 1B/1R translokacije na miksografska svojstva kineske krušne pšenice, ispitivali su Liu i sur. (2005.). Utvrđen je značajan negativan utjecaj 1B/1R translokacije na svojstva tijesta. Zaključeno je da su visoka frekvencija nepoželjnih HMW i LMW gluteninskih podjedinica i prisutstvo 1B/1R translokacije odgovorni za loša svojstva glutena kineske germplazme. Navode da smanjenje frekvencije 1B/1R translokacije i integracija poželjnih podjedinica Glu-1 i Glu-3 lokusa kao što su 1, 7+8, 14+15, 5+10, Glu-A3d i Glu-B3d mogu doprinijeti poboljšanju kvalitete glutena kineskih pšenica.

Zhang i sur. (2007.) ispitivajući genotipove sa i bez 1B/1R translokacije utvrdili su da oni s navedenom translokacijom imaju značajno veći sadržaj  $\omega$  – gliadina i nisku razinu glutenina i LMW podjedinica, ali nije utvrđena značajna razlika u svojstvima tijesta i kvaliteti kruha između genotipova sa i bez translokacije. Gliadini su više doprinosili

sadržaju proteina u brašnu nego glutenini, dok su glutenini i njihove frakcije doprinosili snazi tijesta i kvaliteti kruha. Utvrđena je slaba korelacija između proteinskih frakcija i svojstava tijesta i kvalitete brašna među genotipovima s translokacijom.

Utjecaj 1BL/1RS translokacije na tolerantnost na sušu istraživao je Hoffmann (2008.). Kultivare pšenice sa i bez translokacije uzgajao je u stakleniku pod uvjetima dobre opskrbljenosti vodom i pod sušnim uvjetima. Linije koje su posjedovale translokaciju imale su veću masu korijena i masu izdanka pod oba navedena uvjeta, kao i povećani korijen/izdanak omjer. Veća biomasa korijena translokacijskih linija doprinijela je povećanom žetvenom indeksu kao i povećanoj efikasnosti korištenja vode u uvjetima suše, što je rezultiralo i manjim padom prinosa u odnosu na linije bez translokacije.

Zheng i sur. (2009.) ispitivali su utjecaj gluteninskih alela i 1RS translokacije na svojstva miješanja tijesta na 96 kultivara pšenice. Utvrđeno je da Glu-D1 i Glu-B3 lokus i 1RS translokacija imaju veći utjecaj na svojstva miješanja tijesta u odnosu na druge gluteninske lokuse. 1BL/1RS translokacija imala je negativan utjecaj na svojstva miješanja tijesta.

Distribuciju 1BL/1RS translokacije među 33 kultivara iranske ozime i jare pšenice ispitivali Mirzaghaderi i sur. (2011.). Od 33 kultivara, 9 je imalo poznatog donora translokacije, a preostala 24 bila su nasumce odabrana. Prisutstvo translokacije potvrđeno je u 4 kultivara korištenjem genomske in situ hibridizacije. Kultivari s potvrđenom translokacijom i nekoliko kultivara bez translokacije uzgajani su u hidroponskoj otopini s 0 i 200 mM NaCl. Usporedbom je utvrđeno da 1BL/1RS kultivari imaju znatno nižu masu suhe tvari cijele biljke i masu suhe tvari korijena u prisutnosti 200 mM NaCl u odnosu na kultivare bez translokacije. Nije utvrđena značajna razlika između kultivara sa i bez translokacije u pogledu Na<sup>+</sup> koncentracije i K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> omjera u listu i korijenu.

## 2.2. Metode identifikacije translokacije

Isprva su oplemenjivači pšenice prisutstvo 1B/1R translokacije utvrđivali fenotipski, na način da su iz cijepajućih populacija izdvajali genotipove otporne na bolesti i štetnike, pod pretpostavkom da upravo oni nose navedenu translokaciju (Rayburn i Carver, 1988.). Moonen i Zeven (1984.) navode da se prijenos genetskog materijala raži u genom pšenice osim proučavanjem otpornosti može utvrditi i proučavanjem rodoslovlja, morfologije kromosoma tijekom mejoze i elektroforezom proteina sjemena. Kasnije su uglavnom korištene metode kao SDS-PAGE - sodium-dodecil-sulfonat poliakrilamid gel

elektroforeza, GISH - genomska in situ hibridizacija, FISH – fluorescentna in situ hibridizacija te N i C banding metode (Moonen i Zeven, 1984., Lapitan i sur., 1986., Rayburn i Carver, 1988., Cai i Liu, 1989., Le i sur., 1989., Heslop - Harrison i sur., 1990., Jahan i sur.,1990., Gupta i Shepherd, 1992., Schwarzacher i sur., 1992., Miller i sur., 1995., Schlegel i Korzun, 1997., Merker i Forsstrom, 2000., Zhang i sur., 2001., Ko i sur., 2002b.). Također, spominje se korištenje i HPLC metode - tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (Lookhart i sur., 1991.) te bliske-infracrvene refleksijske spektroskopije (Delwiche i sur.,1999.). Glavni nedostatak citoloških metoda jest tehnička i vremenska zahtjevnost, koja predstavlja ograničavajući čimbenik kada se želi na brz i lak način analizirati veliki broj genotipova (Vaillancourt i sur., 2008.).

Molekularne metode identifikacije zasnivaju se na korištenju ponavljajućih sekvenci specifičnih za raž (Tiwari i sur., 2002.). Napravljeno je više genetskih mapa raži i to uglavnom korištenjem RFLP markera, te u manjem broju PCR markera. Budući da je korištenje RFLP markera kompliciranije, skuplje i zahtjeva znatne količine DNA, znanstvenici se sve više okreću PCR tehnikama (Nagy i sur., 2003.). Razvijeni su različiti molekularni markeri za identifikaciju kromatina raži u genomu pšenice: proteini, izozimi, RFLP, AFLP, RAPD, SSR, SSAP, ISSR i SCAR (Rogowsky i sur., 1992., Koebner, 1995., Borner i Korzun, 1998., Hsam i sur., 2000., Masojc i sur., 2001., Korzun i sur., 2001., Ma i sur., 2001., Nadella i sur., 2002., Vaillancourt i sur., 2008.).

Guidet i sur. (1991.) klonirali su DNA probu PAW173 kao fragment duljine 450 bp, koji nije povezan s ostalim grupama ponavljajućih sekvenci specifičnih za raž. Grupa kojoj pripada nazvana je R173 i sastoji se od ponavljajućih sekvenci prisutnih na svih 7 kromosoma raži. Proba je korištena kao molekularni marker za identifikaciju genetskog materijala raži u genomu pšenice.

Koebner (1995.) je razvio oligonukleotidne početnice koje mogu detektirati četiri različite sekvence specifične za raž. Početnice predstavljaju markere na bazi PCR reakcije i imenovane su kao NOR, 5S, TEL i RIS.

PCR marker za lokus Sec-1 razvio je Shimizu (1997.), a može se koristiti za identifikaciju translokacije s obzirom da se Sec-1 lokus, koji kontrolira sintezu proteina sekalina, nalazi na kratkom kraku kromosoma 1R raži.

Prisutnost 1B/1R translokacije, na uzorku od 66 mađarskih pšenica, registriranih između 1978. i 1999., ispitivali su Koszegi i sur. (2000.) korištenjem citoloških metoda. Utvrđeno je da 35 odnosno 53% ispitivanih pšenica ima navedenu translokaciju.

Tiwari i sur. (2002.) ispitivali su prisutstvo 1B/1R translokacije u devetnaest indijskih elitnih genotipova pšenice pomoću STS markera. Korištene su početnice PAWS 5 i PAWS 6 čiji je očekivani produkt amplifikacije DNA fragment veličine 350 bp. Petnaest od devetnaest genotipova imalo je navedeni fragment. Rezultati su potvrđeni i citološkom analizom gdje su kod genotipova s navedenom translokacijom bila prisutna dva satelitna kromosoma.

Dva RAPD markera, koja se mogu koristiti pri detekciji dijelova kromosoma raži u pšenici, a time i u detekciji 1BL/1RS translokacije, identificirali su Ko i sur. (2002.a). Dva markera pod imenom pSc10C i pSc2OH daju fragmente dužine 1012 bp i 1494 bp.

Nagy i Lelley (2003.) genetski su mapirali 26 SSAP markera na 1RS kromosomu u genotipovima pšenice koje se imale 1BL/1RS translokaciju. Fizičkim mapiranjem utvrđena je ravnomjerna raspodjela SSAP markera duž 1RS kromosoma.

Katto i sur. (2004.) razvili su PCR marker za detekciju različitih segmenata kromosoma raži u pšenici. Napravljena su tri seta PCR početnica od kojih je jedan dao fragmente veličine 1.4 kb u kultivarima raži, ali ne i u kultivarima pšenice. Autori smatraju da bi taj set početnica mogao biti univerzalan PCR marker čak i za vrlo malo segmente kromosoma raži u pšenici. Set početnica imenovan je kao F3/R3.

Raspodjelu 1BL/1RS translokacije, među bugarskim kultivarima krušne pšenice, ispitivali su Landjeva i sur. (2006.). Prisutstvo translokacije utvrđeno je u 17 od 31 (54%) kultivar pšenice, korištenjem N-banding analize, PAGE analize rezervnih proteina sjemena i korištenjem DNA markera.

Chai i sur. (2006.) razvili su kodominantni PCR marker za detekciju 1BL/1RS translokacije. Biljke homozigotne za 1BL/1RS translokaciju tako se mogu jasno razlikovati od onih heterozigotnih. PCR analizom dobiveni se fragmenti dužine 1.1 kb (1RS kromosom) i fragmenti dužine 0.6 kb (1BS kromosom).

Iuoras i sur. (2006.) analizirali su 13 kultivara i linija pšenice (od kojih neke s 1BL/1RS translokacijom), 1 kultivar raži, 1 triticales kultivar i 26 linija nastalih iz križanja triticales x

pšenica. Univerzalni marker F3/R3 za kromatin raži identificirao je fragmente dužine oko 1400 bp u kultivaru pšenice Fundulea 4 (koji posjeduje translokaciju), triticales kultivaru, kultivaru raži i u 15 od 26 linija iz križanja triticales x pšenica. Početnica OP H20 identificirala je fragmente dužine 1035 bp u istim kultivarima kao i F3/R3 marker. Početnica UBC 318 identificirala je fragmente dužine 390 bp u većini kultivara identificiranih s F3/R3 i OP H2O.

Prisutstvo 1BL/1RS translokacije, korištenjem molekularnih markera, ispitivali su Zhao i sur. (2009.). U ispitivanje su uključili sedam tipova zimske pšenice Aimengniu i 17 njenih potomaka. Prisutstvo 1RS kromosoma (podrijetlom od kultivara Neuzucht) utvrđeno je u pet od sedam tipova pšenice Aimengniu i u 11 od 17 njenih potomaka.

Yediay i sur. (2010.) ispitivali su devet markera specifičnih za 1RS kromosom raži. Markeri PAWS5/S6, SCM9, O-SEC5-A/O-SEC3-R pokazali su se kao brzo i jednostavno sredstvo za identifikaciju i razlikovanje 1AL/1RS i 1BL/1RS translokacije. Šest od devet markera korišteni su za utvrđivanje zastupljenosti navedenih translokacija u turskom sortimentu pšenice. Od 107 ispitivanih kultivara samo 4% imalo je 1BL/1RS translokaciju, dok 1AL/1RS translokacija nije utvrđena.

Tabibzadeh i sur. (2013.) istraživali su distribuciju 1BL/1RS i 1AL/1RS translokacije među 44 iranska kultivara pšenice, od čega 29 krušnih i 15 durum pšenica. Prisutstvo translokacije utvrđeno je u pet kultivara krušne pšenice korištenjem SDS-PAGE tehnike i tri DNA markera na bazi PCR-a. Rezultati su pokazali da je frekvencija 1BL/1RS translokacije među iranskim kultivarima vrlo niska (5 kultivara krušne pšenice), a 1AL/1RS translokacija nije pronađena.

Prisutnost i distribuciju 1AL/1RS i 1BL/1RS translokacije, među 66 iranskih i 70 stranih kultivara krušne pšenice, ispitivali su Bagherikia i sur. (2014.). U ispitivanju su korištena tri PCR markera: RYE R3/F3, O-SEC5'-A/O-SEC3'-R i PAW S5/S6. Markerom RYE R3/F3 utvrđeno je prisutstvo 1RS kromosoma raži u 15 (23%) iranskih kultivara i u 2 (3%) strana kultivara. Markeri O-SEC5'-A/O-SEC3'-R i PAW S5/S6 korišteni su za razlikovanje 1AL/1RS i 1BL/1RS translokacija te je tako 1BL/1RS translokacija utvrđena u 14 (21%) iranskih kultivara i u dva (3%) strana kultivara.



### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Biljni materijal

Istraživanje je provedeno na 40 kultivara heksaploidne ozime pšenice (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* L.) te na dva kultivara raži (*Secale cereale* L.). Od 40 kultivara heksaploidne ozime pšenice, 23 su hrvatskog, a 17 stranog podrijetla. Pri odabiru kultivara uključeno je svih pet oplemenjivačkih centara u Republici Hrvatskoj te je odabir napravljen s obzirom na podrijetlo, rodoslovlje, godinu priznavanja te značajnost u proizvodnji. Od 23 hrvatska kultivara, 11 je kreirano na Poljoprivrednom institutu Osijek, pet na Bc Institutu (Zagreb), tri pripadaju oplemenjivačkoj kući Jošt sjeme – istraživanja d.o.o. (Križevci), dva oplemenjivačkoj kući Agrigenetics d.o.o. (Osijek), a jedan Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Kultivari su priznati između 1936. i 2010. godine (Tablica 1). Od 17 stranih kultivara, šest je srpskih, tri mađarska, dva njemačka, dva talijanska i po jedan ukrajinski, ruski, kineski i švicarski kultivar (Tablica 2). Dva kultivara raži također su stranog podrijetla (Tablica 3). Pojedini strani kultivari pšenice, uz kultivare raži, poslužili su kao kontrole pri identifikaciji 1B/1R translokacije.

Tablica 1. Rodoslovlje, godina priznavanja i podrijetlo hrvatskih kultivara pšenice

Br.	Kultivar	Rodoslovlje	Godina	Podrijetlo
1	U1	Carlotta Strampeli/Marquis	1936.	PIO
2	Osječka 20	Osk. 6.9-1-64/V-188-M	1978.	PIO
3	Slavonija	Osječka 20/Osk.4.216-2-76	1984.	PIO
4	Žitarka	Osk.6.30-20/Slavonka/3/Eph. M68/Osk.154-19/Kavkaz	1985.	PIO
5	Srpanjka	Osk. 4.50.-1-77/Zg-2696	1989.	PIO
6	Demetra	Osk. 4.216-2-76/Zg 2877-74	1991.	PIO
7	Superžitarka	GO 3135/Žitarka	1997.	PIO
8	Zlatna Dolina	Zg 414-57/Leonardo	1971.	Bc Institut
9	Golubica	Slavonija/Gemini	1998.	PIO
10	Janica	Osk. 5.36-9-91/Srpanjka	2003.	PIO
11	Barbara	GO 3135/Žitarka	1997.	PIO
12	Nova Žitarka	FS-800/89/Žitarka	2010.	PIO
13	Sana	Mura/CI 14123//Zg 2413-72	1983.	Bc Institut
14	BC Elvira	Bc 2377-79/MV-C2-33//Irena	2002.	Bc Institut

15	Adriana	ZG 1758/70/TpR-349	1988.	Bc Institut
16	Marija	Venera/NSJP-49	1995.	Bc Institut
17	Prima	Sana/Gala	2001.	Bc Institut
18	Kuna	St 563/Skopljanka	1995.	AGRZG
19	Cerera	NE-7060-76-Y-342/VG-19	1993.	Jošt sjeme
20	Koleda	NE-7060-76-Y-335/VG-19	1998.	Jošt sjeme
21	Divana	Favorit/5/Cirpiz/4/J.Kwang/2/ Atlas66/Comanc,/3/Velvet	1995.	Jošt sjeme
22	Gabi	Srpanjka/GK 32-38	1999.	AgriGenetics d.o.o.
23	Dea	Srpanjka/Brutus	2005.	AgriGenetics d.o.o.

Tablica 2. Rodoslovlje, godina priznavanja i podrijetlo stranih kultivara pšenice

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

Tablica 3. Godina priznavanja i podrijetlo kultivara raži

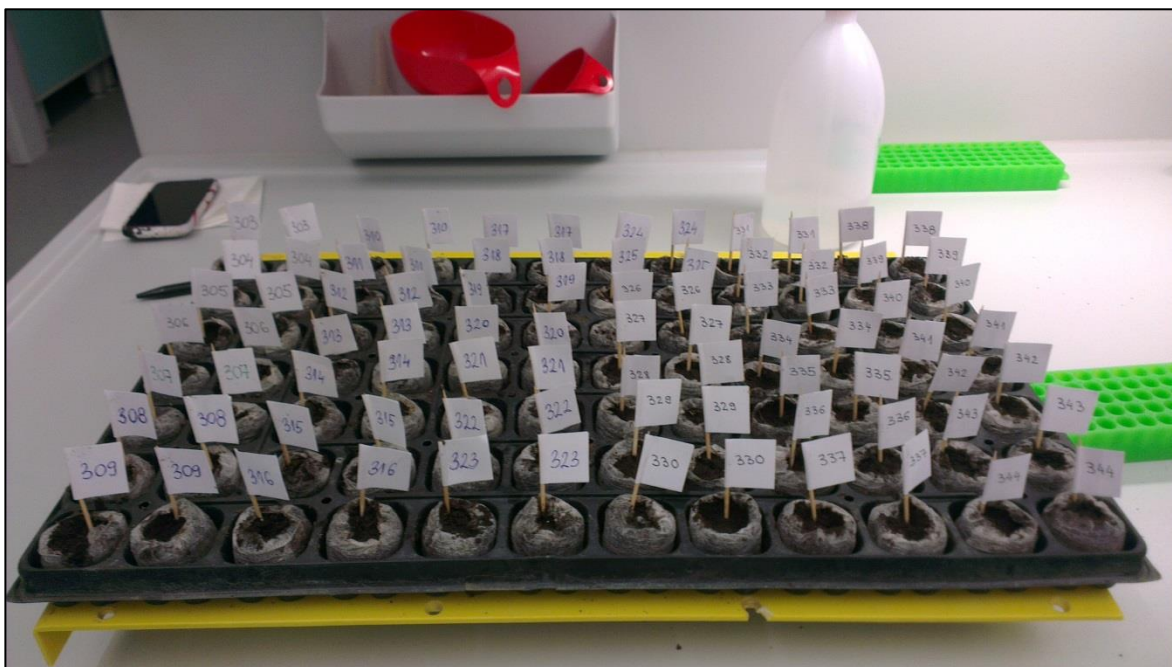
Br.	Kultivar	Godina	Podrijetlo
1	Picasso	1991.	Čehoslovačka
2	Albedo	1991.	Čehoslovačka

### 3.2. Laboratorijski pokus

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku tijekom akademske godine 2013./2014.

#### 3.2.1. Uzgoj klijanaca

Sjeme svakog kultivara posijano je u tresetne tablete (Jiffy 7), prethodno nakvašene vodom (Slika 1), te stavljeno na naklijavanje dva tjedna u klima komoru. Temperatura u klima komori održavana je na 20°C uz svjetlosni režim 12 sati svjetlo/12 sati tama, uz povremeno zalijevanje. Listovi su prikupljeni u fazi dva do tri lista te pohranjeni na -80°C.



Slika 1. Sjeme posijano u tresetne tablete (foto original; S. Guberac)

### 3.2.2. Izolacija genomske DNA

Izolacija DNA iz listova provedena je prema cetil-trimetil-amonij-bromid metodi (CTAB) (Doyle i Doyle, 1987.), modificiranoj prema Grljušić (2003.). Od svakog kultivara odvagano je oko 20 mg odrezanih listova, koji su stavljeni u prethodno ohlađene tarionike. Listovi su prelivevi tekućim dušikom te su tučkom smrvljeni u fini prah. U svaki uzorak pipetom je dodano 1000  $\mu$ l 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 zagrijan na 68°C u vodenoj kupelji. Sadržaj iz tarionika prenesen je u prethodno označene Eppendorf tubice od 2 ml te kratko vorteksiran. Tubice su zatim stavljene na 65°C u vodenu kupelj 45 minuta, uz povremeno okretanje (Slika 2).



Slika 2. Vodena kupelj za inkubaciju tubica (foto original; S. Guberac)

Nakon inkubacije u vodenoj kupelji tubice su stavljene na led, gdje je u svaki uzorak dodano 670  $\mu$ l SEVAGA (kloroform izoamilni alkohol). Svaki uzorak pojedinačno protrešen je rukom okretanjem tubice te su sve tubice stavljene na stalak za mućkanje 30 minuta (Slika 3). Tubice su zatim stavljene na centrifugiranje 8 minuta na brzinu od 14 000 o/min (Slika 4).



Slika 3. Uzorci na stalku za mućkanje (foto original; S. Guberac)



Slika 4. Centrifugiranje uzoraka (foto original; S. Guberac)



Pipetom je iz tubica izvučena vodenasta faza (oko 750  $\mu$ l), koja se izdvojila centrifugiranjem, te je prenešena u novooznačene tubice od 2 ml. U svaku novu tubicu dodano je 16  $\mu$ l RNAze. Tubice su ostavljene na sobnoj temperaturi na stalku za mućkanje 30 minuta, uz povremeno ručno okretanje. U svaku tubicu zatim je dodano 650  $\mu$ l 0.7 V hladnog izopropanola. Tubice su lagano okretane rukom dok DNA nije postala vidljiva. Izopropanol je ostavljen u tubicama oko dva sata uz povremeno okretanje rukom nakon čega su tubice centrifugirane 1 minutu na 14 000 o/min. Nakon centrifugiranja tekućina je pažljivo izlivena kako se ne bi izgubila bijela peleta formirana na dnu tubice. U tubice je zatim dodano 500  $\mu$ l 0.2 mM natrij acetata u 76% etanolu te su pelete prane oko 30 minuta laganim treskanjem tubice. Nakon toga centrifugirane su 2 minute na 14 000 o/min te je tekućina iznad pelete ponovno pažljivo izlivena. U tubice je dodano 500  $\mu$ l 10 mM amonij acetata u 76% etanolu te su pelete prane oko 10 minuta. Tubice su ponovno stavljene na centrifugu 1 minutu na 14 000 o/min nakon čega je izlivena tekuća faza. Preostali etanol odstranjen je pipetom, a tubice ostavljene otvorene u digestoru oko 45 min. Nakon sušenja peletama je dodano 100  $\mu$ l 1X TE pufera kako bi se otopile. Tubice su zatim kratko centrifugirane i pohranjene na + 4°C. Idući dan još jednom su protrešene prstom te su uzorci pohranjeni na – 20°C.

### 3.2.3. Provjera čistoće i koncentracije DNA

Provjera čistoće DNA provodi se mjerenjem apsorbance otopine DNA na dvije valne duljine, 260 i 280 nm. Čistoća izolirane DNA provjerena je na Varian Cary® 50 UV-Visible spektrofotometru. Otopina DNA priređena je dodavanjem 15  $\mu$ l čiste DNA i 735  $\mu$ l TE pufera. Po svakom uzorku napravljena su dva ponavljanja. Čistoća izolirane DNA utvrđena je na temelju omjera apsorbanci A 260 i A 280. DNA zadovoljavajuće čistoće imala je vrijednosti A 260/A 280 između 1.5 i 2.0. Uzorci DNA za koje je utvrđena loša kvaliteta spektrofotometrijskom analizom ponovno su izolirani.

Koncentracija DNA (ng/ $\mu$ l) izračunata je iz dobivenih vrijednosti apsorbanci prema formuli:

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

Radni uzorci za PCR pripremljeni su na način da je za svaki pojedini uzorak izračunata količina DNA i TE pufera za PCR razrjeđenje 1:5 (Tablica 4) prema formulama:

$$\text{DNA } (\mu\text{l}) = 20/[\text{DNA}] * 50$$

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

Koncentracija DNA provjerena je elektroforezom u usporedbi s  $\lambda$  DNA, čija je koncentracija unaprijed poznata. Uzorci DNA za koje je utvrđena loša kvaliteta usporedbom s  $\lambda$  DNA ponovno su izolirani.

Tablica 4. Koncentracije DNA i PCR razrjeđenja

Br.	Kultivar	[DNA] ng/ $\mu$ l	PCR razrjeđenje 1:5 ( $\mu$ l)		Br.	Kultivar	[DNA] ng/ $\mu$ l	PCR razrjeđenje 1:5 ( $\mu$ l)	
			DNA	TE 8.00				DNA	TE 8.00
1	U1	335.50	2.98	47.02	22	Gabi	910.3	1.10	48.90
2	Osječka 20	241.50	4.14	45.86	23	Dea	711.3	1.41	48.59
3	Slavonija	470.50	2.13	47.87	24	Kavkaz	562.8	1.78	48.22
4	Žitarka	680.75	1.47	48.53	25	Florida	897.3	1.11	48.89
5	Srpanjka	333.33	3.00	47.00	26	Mv14	410.0	2.44	47.56
6	Demetra	249.80	4.00	46.00	27	Pesma	235.5	4.25	45.75
7	Superžitarka	423.80	2.36	47.64	28	NS 602	435.8	2.29	47.71
8	Zlatna dolina	141.50	7.07	42.93	29	Renesansa	373.8	2.68	47.32
9	Golubica	445.50	2.24	47.76	30	Sofia NS	718.3	1.39	48.61
10	Janica	640.50	1.56	48.44	31	Sava	338.8	2.95	47.05
11	Barbara	357.00	2.80	47.20	32	NS Rana 1	615.8	1.62	48.38
12	Nova Žitarka	783.50	1.28	48.72	33	San Pastore	267.8	3.73	46.27
13	Sana	834.25	1.20	48.80	34	Libellula	520.0	1.92	48.08
14	BC Elvira	401.75	2.49	47.51	35	Mironovskaya 88	780	1.28	48.72
15	Adriana	281.75	3.55	46.45	36	Bankuty 1205	825.8	1.21	48.79
16	Marija	847.80	1.18	48.82	37	SW Maxi	671.8	1.49	48.51
17	Prima	508.50	1.97	48.03	38	Chinese Spring	1414.5	0.71	49.29
18	Kuna	606.50	1.65	48.35	39	Golin	458.3	2.18	47.82
19	Cerera	573.30	1.74	48.26	40	Mv 18	970.5	1.03	48.97
20	Koleda	566.00	1.77	48.23	41	Picasso	564.5	1.77	48.23
21	Divana	622.50	1.61	48.39	42	Albedo	514.8	1.94	48.06

### 3.2.4. PCR analiza

Za PCR analizu prisutnosti 1AL/1RS i 1BL/1RS translokacije korištena su četiri molekularna markera specifična za raž i to RIS, SCM9, RYE-NOR i PAW161. Sekvence početnica navedenih markera i njihove reference prikazane su u Tablici 5. Prije pripreme reakcijskih smjesa za PCR analizu napravljena su razrjeđenja oligonukleotidnih početnica dodavanjem TE pufera prema Tablici 6. Zatim je u tubice od 0.5 ml dodano 10 µl razrijeđenih početnica i 100 µl d.d. H<sub>2</sub>O. Tubice su čuvane na -20°C.

Tablica 5. Sekvence korištenih početnica

Marker	Sekvence početnica (5' → 3')	Referenca
RIS	F: TAA TTT CTG CTT GCT CCA TGC R: ACT GGG GTG CAC TGG ATT AG	Koebner (1995.)
SCM9	F: TGA CAA CCC CCT TTC CCT CGT R: TCA TCG ACG CTA AGG AGG ACC C	Saal and Wricke (1999.)
RYE-NOR	F: GCA TGT AGC GAC TAA CTC ATC R: CCC AGT TTT CCA TGT CGC	Koebner (1995.)
PAW161	F: TGA GGG CCC AGA CGG CCC TTT TTG R: TTA TCG CAA TTA CAA CTC AAA TTT	Guidet et al. (1991.)

Tablica 6. Razrjeđenja početnica

Početnice	TE 8.00 (µl)
RIS_F	109
RIS_R	101
SCM9_F	114
SCM9_R	93
RYE-NOR_F	210
RYE-NOR_R	193
PAW161_F	242
PAW161_R	284

Očekivani produkt amplifikacije za RIS početnice bio je fragment dužine 110 bp, a za RYE-NOR početnice očekivani su produkti amplifikacije bili fragmenti dužine 400, 600 i



800 bp. Amplifikacija je obavljena prema MAS Wheat protokolu. Reakcijska smjesa za PCR analizu sadržavala je amplifikacijske reagense, odgovarajuće početnice i genomsku DNA. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese bili su jednaki za RIS i RYE-NOR markere, a navedeni su u Tablici 7.

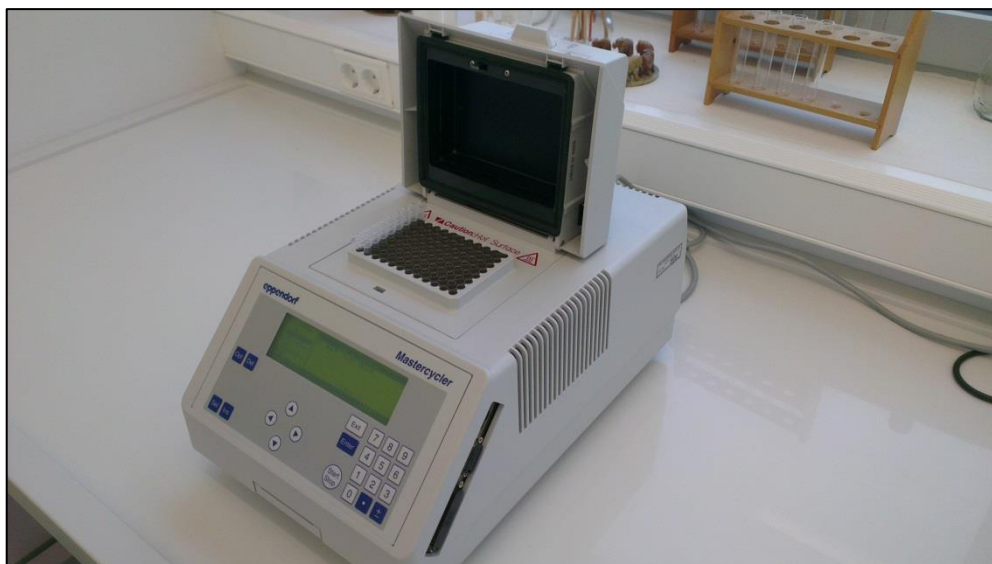
Tablica 7. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR amplifikaciju RIS i RYE-NOR početnica

Reakcijska smjesa	Koncentracija		Volumen po reakciji
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	1 x	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	0.8 µl
dNTP mix	2.5 mM	0.08 mM	0.32 µl
F – početnica	10 µl	0.04 µM	0.04 µl
R – početnica	10 µl	0.04 µM	0.04 µl
Taq polimeraza	5U/µl	0.02 U/µl	0.04 µl
Genomska DNA	2 µl		2 µl
d.d. H <sub>2</sub> O			3.204 µl
<b>Ukupno</b>			<b>10 µl</b>

Za PCR analizu korišten je uređaj Eppendorf Mastercycler® Thermal Cyclers 53333 Version 20.30.33-09 (Slika 5), prema programu navedenom u Tablici 8.

Tablica 8. PCR program za RIS i RYE-NOR početnice

PCR program:		
<b>1. Korak</b>	94°C 4 min	
<b>2. Korak</b>	94°C 15'	30x
	65°C 45'	
	72°C 45'	
<b>3. Korak</b>	72°C 7 min	



Slika 5. Uzorci u uređaju za PCR analizu (foto original; S. Guberac)

Očekivani produkt amplifikacije SCM9 početnica bio je fragment dužine 206 bp za 1BL/1RS translokaciju i fragment dužine 226 bp za 1AL/1RS translokaciju. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR analizu navedeni su u Tablici 9., a korišteni PCR program u Tablici 10.

Tablica 9. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR amplifikaciju SCM9 početnica

Reakcijska smjesa	Koncentracija		Volumen po reakciji
	Ishodišna	Radna	
<b>PCR pufer</b>	5 x	1x	2 $\mu$ l
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1.75 mM	0.7 $\mu$ l
<b>dNTP mix</b>	2.5 mM	0.2 mM	0.8 $\mu$ l
<b>F – početnica</b>	10 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
<b>R – početnica</b>	10 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
<b>Taq polimeraza</b>	5 U/ $\mu$ l	0.125 U/ $\mu$ l	0.125 $\mu$ l
<b>Genomska DNA</b>	3 $\mu$ l		2 $\mu$ l
<b>d.d. H<sub>2</sub>O</b>			4.525 $\mu$ l
<b>Ukupno</b>			10 $\mu$ l

Tablica 10. PCR program za SCM9 početnice

<b>PCR program:</b>			
<b>1. Korak</b>	94°C	2 min	
<b>2. Korak</b>	94°C	60'	40x
	63°C	60'	
	72°C	60'	
<b>3. Korak</b>	72°C	5 min	

Očekivani produkt amplifikacije za PAW161 početnice bio je fragment dužine 360 bp. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR analizu navedeni su u Tablici 11., a korišteni PCR program u Tablici 12.

Tablica 11. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR amplifikaciju PAW161 početnica

<b>Reakcijska smjesa</b>	<b>Koncentracija</b>		<b>Volumen po reakciji</b>
	Ishodišna	Radna	
<b>PCR pufer</b>	5 x	1 x	2 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	2 mM	0.8 µl
<b>dNTP mix</b>	2.5 mM	0.2 mM	0.8 µl
<b>F – početnica</b>	10 µl	0.2 µM	0.2 µl
<b>R – početnica</b>	10 µl	0.2 µM	0.2 µl
<b>Taq polimeraza</b>	5U/µl	0.05 U/µl	0.1 µl
<b>Genomska DNA</b>	3 µl		2 µl
<b>d.d. H<sub>2</sub>O</b>			4.01 µl
<b>Ukupno</b>			10 µl

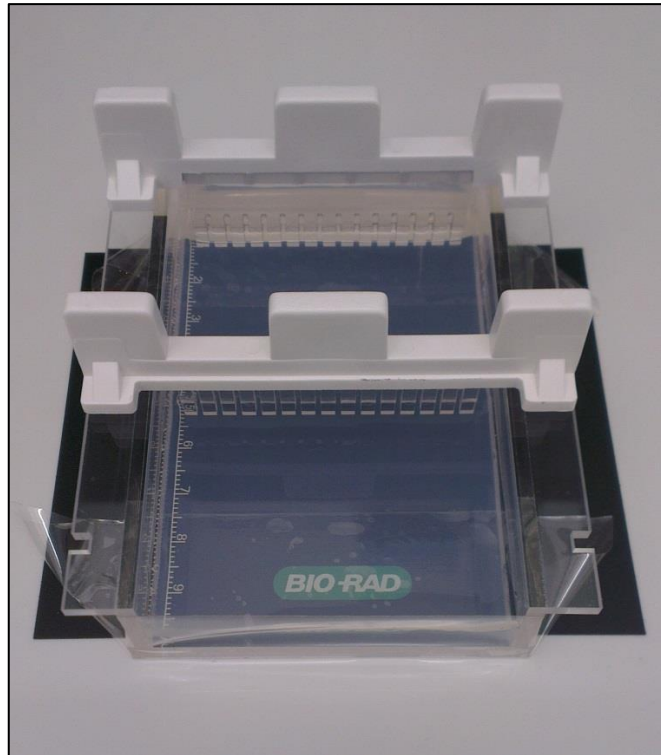
Tablica 12. PCR program za PAW161 početnice

<b>PCR program:</b>		
<b>1. Korak</b>	95°C 3 min	
<b>2. Korak</b>	94°C 45'	30x
	60°C 60'	
	72°C 90'	
<b>3. Korak</b>	72°C 5 min	

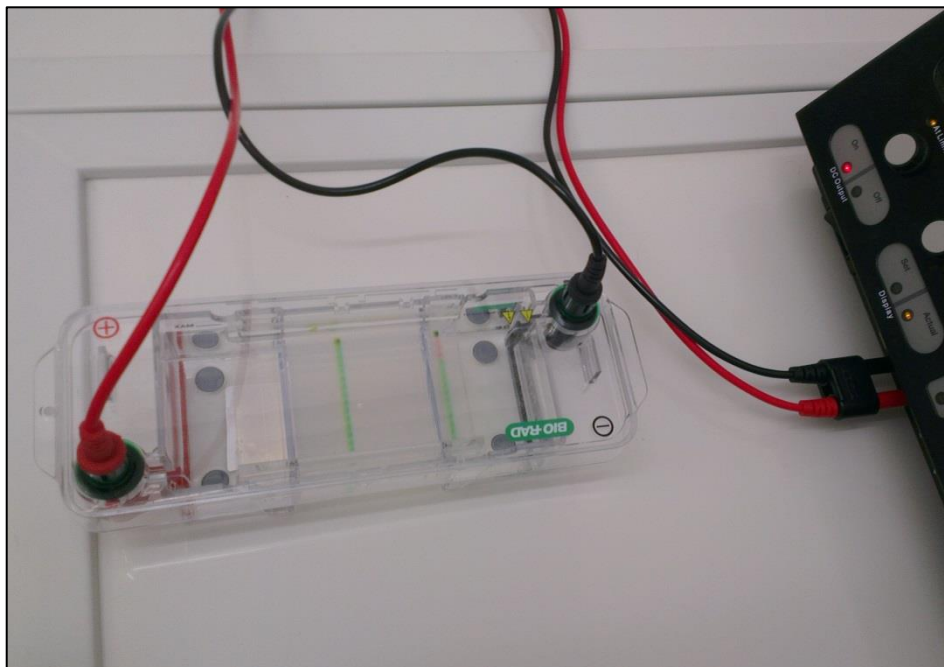
### 3.2.5. Elektroforeza

Produkti PCR analize nanoseni su na 2% agarozni gel radi razdvajanja i daljnje analize. Gel je bio veličine 7x10 cm i debljine 1 cm, a priređen je na sljedeći način. U Erlenmayerovu tikvicu od 200 ml odvagano je 1.2 g agaroze Lonza SeaKem® te je menzurom dodano 60 ml 1x TBE pufera. Tikvica je zagrijavana u mikrovalnoj pećnici oko dvije minute uz povremeno miješanje. Nakon toga tikvica je ohlađena u vodenoj kupelji, ponovno uz lagano miješanje, na temperaturu od oko 60°C. Sadržaju tikvice dodane su 2-3 kapi fluorescentne Olerup SSP® GelRed boje te je zatim izliven u prethodno priređenu kadnicu. Gel je ostavljen na sobnoj temperaturi oko 20 minuta. Nakon hlađenja i stiskanja gela izvađeni su češljici, prethodno stavljeni radi stvaranja jažica za nanošenje uzoraka (Slika 6).

Gel je postavljen u uređaj za elektroforezu, Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT, gdje je bio uronjen u 1x TBE pufer (Slika 7). U svaku jažicu pipetom je nanesen po jedan uzorak u količini od 5 µl. Kao standard za utvrđivanje veličine fragmenata PCR produkata korištene su DNA ljestve, Promega® 100 bp Ladder, s rasponom veličine fragmenata od 100 do 1000 bp, zajedno s pripadajućom bojom, 6x Blue/Orange Loading Dye. Nakon što je uređaj spojen na izvor električne energije podešen je na 60 V, 50 mA i 40 W te pušten u rad. Elektroforeza je u prosjeku trajala oko 45 minuta.



Slika 6. Kadica s agaroznim gelom (foto original; S. Guberac)



Slika 7. Elektroforeza PCR produkata (foto original; S. Guberac)

### 3.2.6. Očitavanje rezultata

Nakon završene elektroforeze agarozni gel s PCR produktima uslikan je pomoću Syngene® G:BOX F3 uređaja za snimanje. Uređaj u sebi ima ugrađenu kameru rezolucije 3.8 megapixelsa kao i GeneSys softver. Rezultati su očitani pomoću Syngene® programa GeneTools, koji je kompatibilan s GeneSys softverom ver. 1.4.1.0. (Slika 8).



Slika 8. Uređaj za snimanje gela - G:BOX F3 (foto original; S. Guberac)

#### 4. Rezultati

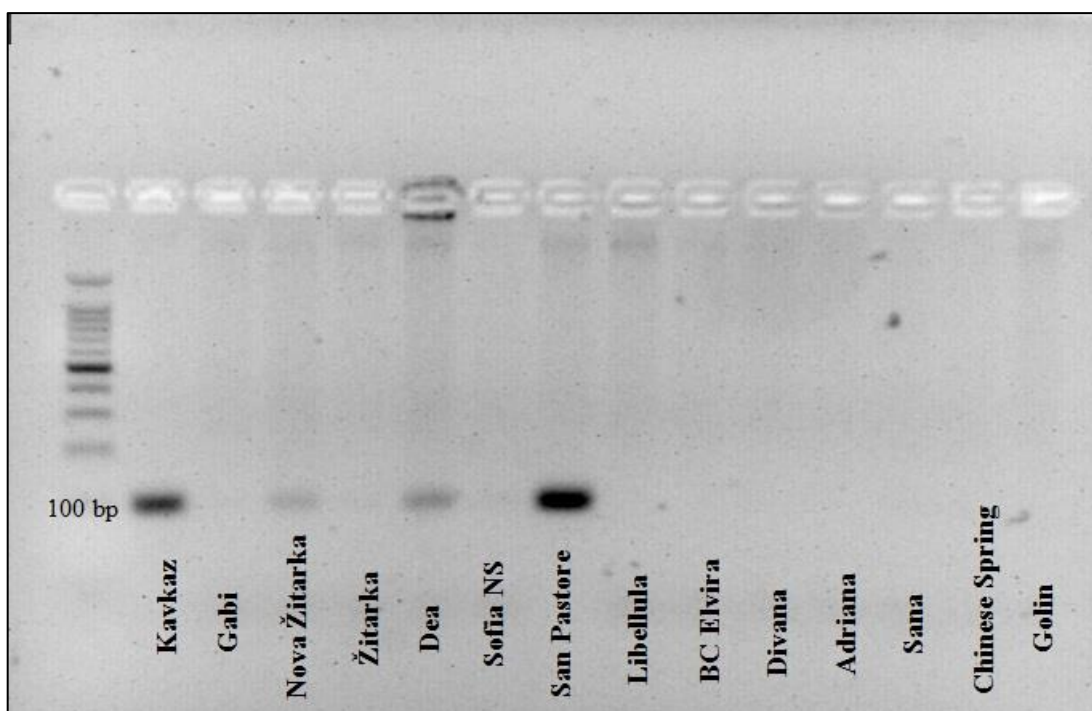
Nakon što su gelovi s produktima PCR-a uslikani, a slike obrađene pomoću Syngene® GeneTools programa, dobiveni rezultati istraživanja unešeni su u Tablicu 13., koja prikazuje prisutnost translokacije na istraživanim kultivarima, utvrđenu korištenjem prethodno navedenih molekularnih markera.

Tablica 13. Prisutnost translokacije utvrđena različitim molekularnim markerima

Br	Kultivar	Marker				Br	Kultivar	Marker			
		RIS	SCM9	RYE- NOR	PAW 161			RIS	SCM9	RYE- NOR	PAW 161
1	U1					22	Gabi				
2	Osječka 20					23	Dea	+			
3	Slavonija					24	Kavkaz	+			+
4	Žitarka					25	Florida				
5	Srpanjka					26	Mv14	+	+	+	+
6	Demetra					27	Pesma				
7	Superžitarka					28	NS 602				
8	Zlatna dolina				+	29	Renesansa				
9	Golubica					30	Sofia NS				
10	Janica					31	Sava				
11	Barbara				+	32	NS Rana 1				
12	Nova Žitarka	+				33	San Pastore	+	+	+	+
13	Sana					34	Libellula				
14	BC Elvira					35	Mironovskaya 88				
15	Adriana					36	Bankuty 1205				
16	Marija	+	+		+	37	SW Maxi				
17	Prima				+	38	Chinese Spring				
18	Kuna	+	+	+	+	39	Golin				
19	Cerera					40	Mv 18	+	+		+
20	Koleda	+	+	+	+	41	Picasso	+	+	+	+
21	Divana					42	Albedo	+	+	+	+

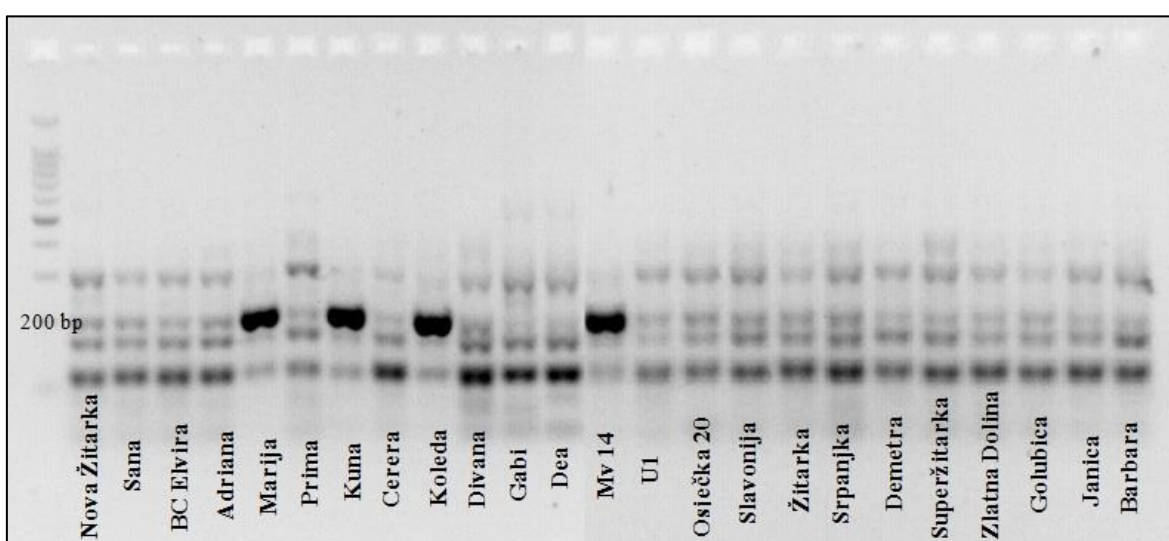
Kultivari kod kojih je prisutnost translokacije utvrđena korištenjem RIS početnica, dali su očekivane produkte amplifikacije veličine oko 110 bp (Slika 9). Od ukupno 40 istraživanih kultivara pšenice translokacija je, korištenjem RIS početnica, utvrđena kod njih devet (Tablica 13). Među 23 hrvatska kultivara pšenice translokacija je utvrđena kod njih pet, i to kod kultivara Nova Žitarka, Marija, Kuna, Koleda i Dea. Od 17 stranih kultivara pšenice translokacija je utvrđena kod njih četiri, i to kod kultivara Kavkaz, Mv 14, San Pastore i Mv 18.





Slika 9. Produkti amplifikacije RIS početnica (foto original; S. Guberac)

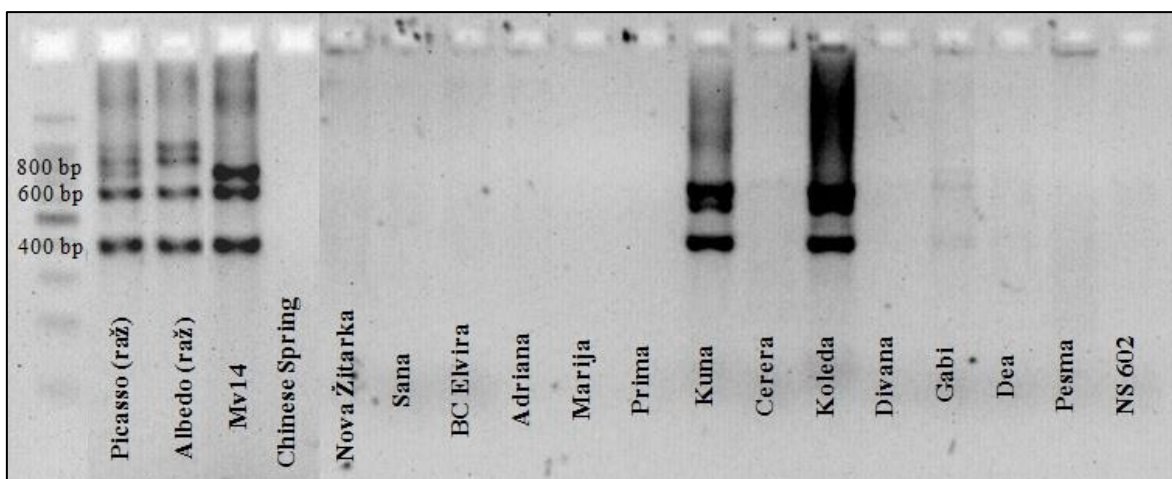
Kultivari kod kojih je prisutnost translokacije utvrđena korištenjem SCM9 početnica, dali su očekivane produkte amplifikacije veličine oko 206 bp (Slika 10). Od ukupno 40 ispitivanih kultivara pšenice translokacija je, korištenjem SCM9 početnica, utvrđena kod njih šest (Tablica 13). Među 23 hrvatska kultivara pšenice translokacija je utvrđena kod njih tri, i to kod kultivara Marija, Kuna i Koleda. Od 17 stranih kultivara pšenice translokacija je utvrđena kod tri, i to kod kultivara Mv 14, San Pastore i Mv 18.



Slika 10. Produkti amplifikacije SCM9 početnica (foto original; S. Guberac)



Kultivari kod kojih je prisutnost translokacije utvrđena korištenjem RYE-NOR početnica, dali su očekivane produkte amplifikacije veličine 400, 600 i 800 bp (Slika 11). Od ukupno 40 ispitivanih kultivara pšenice translokacija je, korištenjem RYE-NOR početnica, utvrđena kod njih četiri (Tablica 13). Među 23 hrvatska kultivara pšenice translokacija je utvrđena kod njih dva, i to kod kultivara Kuna i Koleda. Od 17 stranih kultivara pšenice translokacija je utvrđena kod njih dva, i to kod kultivara Mv14 i San Pastore.



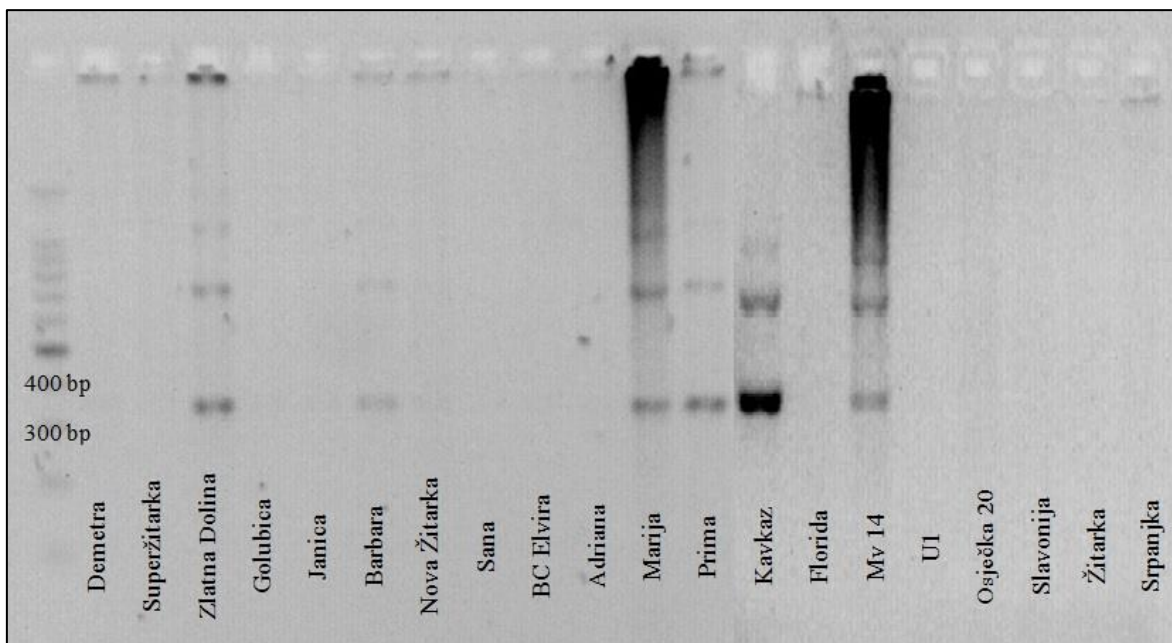
Slika 11. Produkti amplifikacije RYE-NOR početnica (foto original; S. Guberac)

Kultivari kod kojih je prisutnost translokacije utvrđena korištenjem PAW161 početnica, dali su očekivane produkte amplifikacije veličine oko 366 bp (Slika 12). Od ukupno 40 ispitivanih kultivara pšenice translokacija je, korištenjem PAW161 početnica, utvrđena kod njih 10 (Tablica 13). Među 23 hrvatska kultivara pšenice translokacija je utvrđena kod njih šest, i to kod kultivara Zlatna Dolina, Barbara, Marija, Prima, Kuna i Koleda. Od 17 stranih kultivara pšenice translokacija je utvrđena kod njih četiri, i to kod kultivara Kavkaz, Mv 14, San Pastore i Mv 18.

Prisutnost translokacije kod kultivara Kavkaz potvrđena je s dva para početnica (RIS i PAW161), kod kultivara Mv 18 i Marija s tri para početnica (RIS, SCM9 i PAW161), a kod kultivara Mv 14, San Pastore, Kuna i Koleda sa sva četiri para početnica (RIS, SCM9, RYE-NOR i PAW161). Kod ostalih je kultivara translokacija potvrđena samo s jednim parom početnica (Tablica 13).

Generalno je translokacija utvrđena u 12 od 40 (30%) ispitivanih kultivara, dok je među hrvatskim kultivarima pšenice translokaciju imalo osam od 23 (34.78%) kultivara (Zlatna Dolina, Barbara, Nova Žitarka, Marija, Prima, Kuna, Koleda i Dea).

Očekivani produkti amplifikacije sva četiri para početnica dobiveni su i kod dva kultivara raži, Picasso i Albedo, koji su korišteni kao pozitivne kontrole.



Slika 12. Produkti amplifikacije PAW161 početnica (foto original; S. Guberac)

## 5. Rasprava

O zastupljenosti 1B/1R translokacije u hrvatskom sortimentu pšenice postoji vrlo malo objavljenih rezultata istraživanja. Posebice nedostaje istraživanja o povezanosti i utjecaju ove translokacije na gospodarski važna svojstva domaćih kultivara ozime pšenice, te o mogućnostima iskorištavanja 1B/1R translokacije u širokoj proizvodnji. Prisustvo translokacije u domaćim kultivarima pšenice može imati pozitivan utjecaj na prinos nadzemne mase, gustoću sklopa, povećanu masu 1000 zrna kao i nešto veći prinos. Navedeno potvrđuju istraživanja koja su proveli Villareal i sur. (1991.) te Villareal i sur. (1994.), koji navode da uz pravilno primjenjenu agrotehniku, prisutnost 1B/1R translokacije ima pozitivan utjecaj na prinos i kvalitetu pšenice.

Većina 1B/1R kultivara pšenice posjeduje translokaciju podrijetlom od raži Petkus, a nešto manji broj od raži Salmon. Translokacija je od raži Petkus, preko ruskih kultivara pšenice Aurora i Kavkaz prenešena u kultivare pšenice diljem svijeta (Rabinovich, 1998.). Dimitrijević i sur. (2008.) tako navode da je 1B/1R translokacija na naše prostore unesena korištenjem ruskih kultivara Aurora, Kavkaz i Skorospelka u oplemenjivačkim programima bivše Jugoslavije. S obzirom na navedeno, u većini istraživanja se upravo kultivari raži Petkus i Salmon te kultivari pšenice Aurora i Kavkaz koriste kao pozitivne kontrole pri identifikaciji translokacije. U provedenom istraživanju, kao pozitivne kontrole, korišteni su kultivar pšenice Kavkaz te dva kultivara raži, Picasso i Albedo, budući da nam sjeme kultivara raži Petkus nije bilo dostupno. Kao negativna kontrola korišten je kultivar pšenice Chinese Spring koji se u mnogim radovima također navodi kao kontrolni kultivar koji ne posjeduje translokaciju (Weng i sur., 2007., Yediay i sur., 2010., Tabibzadeh i sur., 2013.).

Za identifikaciju translokacije korištena su četiri molekularna markera na bazi PCR-a: RIS (Koebner, 1995.), SCM9 (Saal and Wricke, 1999.), RYE-NOR (Koebner, 1995.) i PAW161 (Guidet i sur., 1991.). Kultivari kod kojih je utvrđena translokacija dali su redom očekivane produkte amplifikacije veličine 110 bp; 206 bp; 400,600 i 800 bp; 366 bp.

Očekivani produkti amplifikacije sve četiri početnice dobiveni su kod dva kultivara raži, dok su kod kultivara pšenice Kavkaz očekivani produkti amplifikacije dobiveni samo s dva para početnica. Točan uzrok toga nije nam poznat, ali postoji mogućnost da je došlo do degradacije DNA, da su uvjeti PCR reakcije bili nepovoljni ili da su korišteni markeri bili

nespecifični. Kod kultivara pšenice Chinese Spring nije bilo nikakvih produkata amplifikacije sa sve četiri početnice.

Istraživanjem je utvrđena zastupljenost 1B/1R translokacije u 12 od 40 (30%) ispitivanih kultivara i u osam od 23 (34.78%) hrvatska kultivara pšenice. Villareal i sur. (1998.) navode da u pojedinim zemljama 90% posijane pšenice ima 1B/1R translokaciju, preko 50% CIMMYT pšenica također posjeduje navedenu translokaciju (Merker, 1982.), u Mađarskoj je utvrđena zastupljenost translokacije 53% (Koszegi i sur., 2000.), u Indiji 78.94% (Tiwari i sur., 2002.), u Bugarskoj 54% (Landjeva i sur., 2006.), u Iranu prema različitim izvorima od 11% do 21% (Mirzaghaderi i sur., 2011., Tabibzadeh i sur., 2013., Bagherikia i sur., 2014), u Srbiji 25% (Denčić i sur., 2008.) itd.

Usporedbom istraživanjem dobivenih rezultata i rodoslovlja pojedinih kultivara može se zaključiti da kultivari kojima je jedan od roditelja bio poznati nositelj translokacije ne moraju nužno imati istu tu translokaciju. Primjerice, kod kultivara Žitarka ispitivanjem nije utvrđeno prisustvo translokacije iako joj je jedan od roditelja Kavkaz, nositelj 1B/1R translokacije. Također, kod kultivara Pesma i Renesansa nije utvrđeno prisustvo translokacije iako njihovi roditelji Balkan (Bačka/Bz/-1//Mironovskaya 808/3/NS433/4/Skorospelka 35), odnosno Jugoslavija (NS646/Bz-1/Aurora) posjeduju navedenu translokaciju. S druge strane, kod kultivara Kuna utvrđena je prisutnost translokacije, koju posjeduje i njezin roditelj Skopljanka (Argelato(L197)/Kavkaz) (Javornik i sur., 1991.). Zanimljivo je i da od dvije sestrinske linije, Cerera i Koleda, jedna posjeduje translokaciju, a druga ne. Iz navedenoga se može zaključiti da samo ispitivanje rodoslovlja nije dovoljan pokazatelj prisutnosti translokacije te da je nužno provođenje istraživanja koje kombinira podatke o porijeklu s podacima molekularne analize. Upravo s ciljem olakšanja i ubrzanja identifikacije translokacije ranije korištene metode sve se više zamjenjuju molekularnim, te je razvijen veliki broj različitih molekularnih markera za identifikaciju genetskog materijala raži u genomu pšenice. Međutim, Weng i sur. (2007.) navode da unatoč tome što je stvoren veliki broj molekularnih markera specifičnih za raž, vrlo je malo istraživanja i podataka o njihovoj evaluaciji i korisnosti za markerima potpomognutu selekciju.

S obzirom da se translokaciju dovodi u vezu s bitnim agronomskim svojstvima pšenice, za oplemenjivače bi informacije o nasljeđivanju i distribuciji navedene translokacije bile vrlo korisne pri planiranju oplemenjivačkih programa. Prisutnost translokacije ima utjecaja i na

povećanje prinosa pšenice, uz povećanje otpornosti na fitopatogene (Tang i sur., 2008.). Istraživanja potvrđuju i povećanje adaptabilnosti, tolerantnosti na stres, stabilnosti i visine prinosa (Rajaram i sur. 1983.).

Mogućnosti korištenja kultivara s navedenom translokacijama svakako su velike i svrsishodne. Jedna od mogućnosti, mogla bi biti povećana otpornost domaćih kultivara pšenice, kod kojih je prisutna translokacija, na pojedine fitopatogene bolesti. To potvrđuju istraživanja koja je proveo McIntosh (1983.), u kojima navodi da kratki krak kromosoma 1R raži nosi gene za otpornost na lisnu hrđu, stabljичnu hrđu, prugastu hrđu i pepelnicu. Međutim, otpornost na neke fitopatogene je već prevladana s obzirom na to da je genetska osnova 1B/1R translokacije prilično uska. Stoga su potrebna dodatna istraživanja na domaćim kultivarima pšenice s ciljem determiniranja ovih svojstava, odnosno otpornosti te je potrebno pronaći novu genetsku varijabilnost među novim izvorima 1R translokacije.

1B/1R translokacija može imati i negativan učinak na tehnološku kvalitetu pšenice. Upravo prisustvo sekalina iz raži i smanjenje broja glutenskih lokusa uvjetuje negativan učinak ove translokacije i dovodi do smanjenja kakvoće sjemena i pokazatelja važnih za mlinarsko-pekarsku industriju (reološka svojstva tijesta). Ovakve rezultate potvrđuju istraživanja većeg broja autora na pojedinim kultivarima pšenice (Moonen i Zeven, 1984., Dhaliwal i sur. 1990.). S time u vezi, iako u provednom istraživanju nisu rađene analize kvalitetnih osobina kultivara, za istaknuti je da visokokvalitetni kultivar (poboljšivač) Divana nema ovu translokaciju.

Često su rezultati istraživanja provedenih na 1B/1R kultivarima vrlo različiti pa ponekad i kontradiktorni. Tako Dhaliwal i sur. (1987.) navode da translokacija 1B/1R, generalno, nema većih štetnih učinaka na masu 1000 zrna, specifičnu masu, sadržaj bjelančevina zrna i brašna, tvrdoću zrna, mlinarsku kvalitetu ili apsorpciju vode. Kod tvrdih pšenica translokacija je utjecala na smanjenje SDS sedimentacijskog volumena, razvoja tijesta i otpornosti na rastezanje, za razliku od mekih pšenica gdje nije bilo značajnijeg utjecaja 1B/1R translokacije na smanjenje istih.

Iako pojedini autori navode negativan utjecaj translokacije na kakvoću brašna sa stajališta mlinsko-pekarske industrije (Wieser i sur. 2000.), drugi pak navode da translokacija 1B/1R ima pozitivan utjecaj na povećanje sadržaja bjelančevina u odnosu na njihove bliske 1B linije te da nema značajnijih razlika u svojstvima mljevenja i ljepljivosti tijesta (Burnett i sur., 1995.).

Razloge oprečnih rezultata moguće je objasniti različitim rodoslovljima ispitivanih kultivara i njihovih genetskih osnova koje imaju utjecaj na učinak 1B/1R translokacije. Tako Ren i sur. (2012.) kao glavne razloge nestalnog učinka 1B/1R translokacije navode utjecaj različitih genetskih osnova pšenice i različitih izvora kromosoma raži. Također smatraju da genetska različitost 1B/1R linija proizlazi ne samo iz utjecaja različitih genetskih osnova pšenice i različitih izvora kromosoma raži, nego i iz njihovih interakcija te od same translokacije.

Iz svega navedenoga, vidljivo je da u istraživanjima utjecaja 1B/1R translokacije na gospodarski važna svojstva pšenice (posebice prinos i kvalitetu) postoji još čitav niz nepoznanica koje se moraju determinirati kroz dodatne laboratorijske i poljske pokuse. Budući da o istraživanjima translokacije među hrvatskim kultivarima ozime pšenice gotovo i nema objavljenih radova, svakako je potrebno obaviti dodatna opsežna istraživanja o toj problematici.

## 6. Zaključak

Na temelju laboratorijskih istraživanja, provednih u laboratoriju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, tijekom 2013. i 2014. godine, u svezi prisustva 1B/1R translokacije u hrvatskom i stranom sortimentu ozime pšenice, može se zaključiti sljedeće:

1. Korištenjem RIS početnica, prisutnost translokacije utvrđena je kod devet od ukupno 40 ispitivanih kultivara pšenice te u pet od 23 hrvatska kultivara pšenice.
2. Korištenjem SCM9 početnica, prisutnost translokacije utvrđena je kod šest od ukupno 40 ispitivanih kultivara pšenice te u tri od 23 hrvatska kultivara pšenice.
3. Korištenjem RYE-NOR početnica, prisutnost translokacije utvrđena je kod četiri od ukupno 40 ispitivanih kultivara pšenice te u dva od 23 hrvatska kultivara pšenice.
4. Korištenjem PAW161 početnica, prisutnost translokacije utvrđena je kod 10 od ukupno 40 ispitivanih kultivara pšenice te u šest od 23 hrvatska kultivara pšenice.
5. Generalno je, korištenjem različitih parova početnica, translokacija utvrđena u 12 od 40 (30%) ukupno ispitivanih kultivara pšenice te u osam od 23 (34.78%) hrvatska kultivara pšenice (Zlatna Dolina, Barbara, Nova Žitarka, Marija, Prima, Kuna, Koleda i Dea).
6. Na temelju dosadašnjih rezultata istraživanja o ovoj problematici u svijetu, postoji niz prednosti, ali vjerojatno i nedostataka koje posjeduju domaći kultivari ozime pšenice s 1B/1R translokacijom, u odnosu na kultivare bez translokacije. Stoga je neophodno obaviti dodatna istraživanja na spomenutim kultivarima te odrediti njihovu reakciju na različite agroekološke uvjete kroz višegodišnja istraživanja na više lokaliteta.

## 7. Popis literature

- Anderson, G.R., Papa, D., Peng, J., Tahir, M., Lapitan, N.L.V. (2003): Genetic mapping of Dn7, a rye gene conferring resistance to the Russian wheat aphid in wheat. *Theoretical and applied genetics*, 107:1297-1303.
- Bagherikia, S., Karimzadeh, G., Naghavi, M.R. (2014): Distribution of 1AL/1RS and 1BL/1RS wheat-rye translocations in *Triticum aestivum* using specific PCR. *Biochemical systematics and ecology*, 55:20-26.
- Börner, A., Korzun, V. (1998): A consensus linkage map of rye (*Secale cereale* L.) including 374 RFLPs, 24 isozymes and 15 gene loci. *Theor Appl Genet*, 97:1279–1288
- Burnett, C.J., Lorenz, K.J., Carver, B.F. (1995): Effects of the 1B/1R translocation in wheat on composition and properties of grain and flour. *Euphytica*, 86:159-166.
- Cai, X., Liu, D. (1989): Identification of a 1B/1R wheat-rye chromosome translocation. *Theoretical and Applied Genetics*, 77:81-83.
- Chai, J.F., Zhou, R.H., Jia, J.Z., Liu, X. (2006): Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL/1RS wheat-rye chromosome translocations. *Plant breeding*, 125:302-304.
- Delwiche, S.R., Graybosch, R.A., Peterson, C.J. (1999): Identification of wheat lines possessing the 1AL/1RS or 1BL/1RS wheat-rye translocation by near-infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Chemistry Journal*, 76:255-260.
- Denčić, S., Obreht, D., Kobiljski, B., Štatkić, S., Bede, M. (2008): Genetska determiniranost kvalitete pšenice. 43. Hrvatski i 3. Međunarodni Simpozij Agronoma. Opatija, 18. - 21. veljače 2008. Hrvatska: 278-281.
- Dhaliwal, A.S., MacRitchie, F. (1990): Contributions of protein fractions to dough handling properties of wheat-rye translocation cultivars. *J. Cereal Sci.*, 12:113-122.
- Dhaliwal, A.S., Mares, D.J., Marshall, D.R. (1987): Effect of 1B/1R Chromosome Translocation on Milling and Quality Characteristics of Braed Wheats. *Cereal Chemistry*, 64: 72-76.



Dimitrijević, M., Petrović, S., Gustafson, J.P. (2008): The effect of wheat-rye translocation 1BL/1RS in a different quality genetic background on biological traits in wheat. *Genetika*, 40:261-270.

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

Ehdaie, B., Whitkus, R.W., Waines, J.G. (2003): Root Biomass, Water – Use Efficiency, and Performance of Wheat – Rye Translocation of Chromosome 1 and 2 in spring wheat „Pavon“. *Crop Science*, 43: 710-717.

Friebe, B., Zeller, F.J., Kunzmann, R. (1987): Transfer of the 1BL/1RS wheat-rye translocation from hexaploid bread wheat to tetraploid durum wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 74:423-425.

Friebe, B., Heun, M., Bushuk, W. (1989): Cytological characterization, powdery mildew resistance and storage protein composition of tetraploid and hexaploid 1BL/1RS wheat-rye translocation lines. *Theor. Appl. Genet.*, 78:425-432.

Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W.J., McIntosh, R.A., Gill, B.S. (1996): Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: Current status. *Euphytica*, 91: 59-87.

Graybosch, R.A., Peterson, C.J., Hansen, L.E., Worrall, D., Shelton, D.R., Lukaszewski, A. (1993): Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL/1RS and 1AL/1RS wheat-rye translocation lines. *Journal of Cereal Science*, 17:95-106.

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

Guidet, F., Rogowsky, P., Taylor, C., Weining, S., Langridge, P. (1991): Cloning and characterization of a new rye-specific repeated sequence. *Genome*, 34: 81—87.

Gupta, R.B., Shepherd, K.W. (1992): Identification of rye chromosome 1R translocations and substitutions in hexaploid wheats using storage proteins as genetic markers. *Plant Breeding*, 109:130-140.

- Heslop-Harrison, J.S., Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Ananthawat-Jonsson, K. (1990): Detection and characterization of 1B/1R translocations in hexaploid wheat. *Heredity*, 65:385-392.
- Hoffmann, B. (2008): Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1RS. *Cereal research communication*, 36: 269-278.
- Horvat, D., Drezner, G., Šimić, G., Dvojković, K. (2006): Rezervne bjelančevine pšenice analizirane RP-HPLC metodom. *Poljoprivreda*, 12: 42-47.
- Hsam, S.L.K., Mohler, V., Hartl, L., Wenzel, G., Zeller, F.J. (2000): Mapping of powdery mildew and leaf rust resistance genes on the wheat – rye translocated chromosome T1BL/1RS using molecular and biochemical markers. *Plant Breeding*, 119:87-89.
- Iuoraş, M., Niculae, L., Ciucă, M., Istrate, Ş., Săulescu, N. N. (2006): Preliminary results on use of molecular markers to identify rye introgressions into the wheat genome. *Romanian Agricultural Research*, 23:21-24.
- Jahan, Q., Ter-Kuile, N., Hashmi, N., Aslam, M., Vahidy, A.A., Mujeeb-Kazi, A. (1990): The status of the 1B/1R translocation chromosome in some released wheat varieties and the 1989 candidate varieties of Pakistan. *Pak.J.Bot.*, 22: 1-10.
- Javornik, B., Sinković, T., vapa, L., Koebner, R.M.D., Rogers, W.J. (1991): A comparison of methods for identifying and surveying the presence of 1BL/1RS translocations in bread wheat. *Euphytica*, 54:45-53.
- Kattermann, G. (1937): Zur Cytologie halmbehaarter Stämme aus Weizenroggenbastardierung. *Züchter*, 9:196-199.
- Katto, M.C., Endo, T.R., Nasuda, S. (2004): A PCR-based marker for targeting small rye segments in wheat background. *Genes Genet. Syst.*, 79:245-250.
- Kim, W., Johnson, J.W., Baenziger, P.S., Lukaszewski, A.J., Gaines, C.S. (2004): Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources. *Crop Science.*, 44:1254-1258.

- Ko, J.M., Do, G.S., Suh, D.Y., Seo, B.B., Shin, D.C.S., Moon, H.P. (2002a): Identification and chromosomal organization of two rye genome – specific RAPD products useful for introgression markers in wheat. *Genome*, 45: 157-164.
- Ko, J.M., Seo, B.B., Suh, D.Y., Do, G.S., Park, D.S., Kwack, Y.H. (2002b): Production of a new wheat line possessing the 1BL/1RS wheat-rye translocation derived from Korean rye cultivar Paldanghomil. *Theoretical and Applied Genetics*, 104:171-176.
- Koebner, R.M.D. (1995): Generation of PCR based markers for the detection of rye chromatin in a wheat background. *Theor. Appl. Genet.*, 90:740-745.
- Korzun, V., Malyshev, S., Voylokov, A.V., Börner, A. (2001): A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci. *Theor Appl Genet*, 102:709–717
- Koszegi, B., Linc, G., Juhasz, A., Lang, L., Molnar-Lang, M. (2000): Occurrence of the 1RS/1BL wheat-rye translocation in Hungarian wheat varieties. *Acta Agronomica Hungarica*, 48: 227-236.
- Kumlay, A.M., Baenziger, P.S., Gill, K.S., Shelton, D.R., Graybosch, R.A., Lukaszewski, A.J., Wesenberg, D.M. (2003): Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat. *Crop science*, 43:1643-1651.
- Landjeva, S., Korzun, V., Tsanev, V., Vladova, R., Ganeva, G. (2006): Distribution of wheat-rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria. *Plant Breeding*, 125:102-104.
- Lapitan, N.L.V., Sears, R.G., Rayburn, A.L., Gill, B.S. (1986): Detection of chromosome breakpoints by in situ hybridization with biotin labeled DNA probe. *Journal of Heredity*, 77: 415-419.
- Le, H.T., Armstrong, K.C., Miki, B. (1989): Detection of Rye DNA in Wheat-Rye Hybrids and Wheat Translocation Stocks Using Total Genomic DNA as a Probe. *Plant Molecular Biology Reporter*, 7: 150-158.
- Lelley, T., Eder, C., Grausgruber, H. (2004): Influence of 1BL/1RS wheat-rye chromosome translocation on genotype by environment interaction. *Journal of Cereal Science*, 39: 313-320.

- Liu, L., He, Z., Yan, J., Zhang, Y., Xia, X., Pena, R.J. (2005): Allelic variation at the Glu-1 and Glu-3 loci, presence of the 1B/1R translocation, and their effects on mixographic properties in Chinese bread wheats. *Euphytica*, 142:197-204.
- Lookhart, G.L., Graybosch, R., Peterson, J., Lukaszewski, A. (1991): Identification of wheat lines containing the 1BL/1RS translocation by high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem*, 68: 312-316.
- Lukaszewski, A.J. (2001): Breeding behavior of the cytogenetically engineered wheat rye translocation chromosome 1RS.1BL. *Crop Science*, 41:1062-1065.
- Luo, P.G., Zhang, H.Y., Shu, K., Zhang, H.Q., Luo, H.Y., Ren, Z.L. (2008): Stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp.tritici) resistance in wheat with the wheat-rye 1BL/1RS chromosomal translocation. *Canadian journal of plant pathology*, 30:254-259.
- Ma, X.F., Wanous, M.K., Houchins, K., Rodriguez, M.M.A., Goicoechea, P.G., Wang, Z., Xie, M., Gustafson, J.P. (2001): Molecular linkage mapping in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet*, 102:517–523.
- Mago, R., Miah, H., Lawrence, G.J., Wellings, C.R., Spielmeier, W., Bariana, H.S., McIntosh, R.A., Pryor, A.J., Ellis, J.G. (2005): High – resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes Sr31, Lr26 and Yr9 on the short arm of rye chromosome 1. *Theoretical and applied genetics*, 112:41-50.
- Mago, R., Spielmeier, W., Lawrence, G.J., Lagudah, E.S., Ellis, J.G., Pryor, A. (2002): Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 104:1317-1324.
- Martin, P., Carrillo, J.M. (1999): Cumulative and interaction effects of prolamin allelic variation of 1BL/1RS translocation on flour quality in bread wheat. *Euphytica*, 108: 29-39.
- Martin, P., Gomez, M., Carrillo, J.M. (2001): Interaction between allelic variation at the Glu-D1 locus and a 1BL/1RS translocation on flour quality in bread wheat. *Crop science*, 41:1080-1084.
- Martinčić, J., Kozumplik, V. (1996): Oplemenjivanje bilja. Zagreb, 1996.

- Masojc, P., Myskow, B., Milczarski, P. (2001): Extending a RFLP-based genetic map of rye using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and isozyme markers. *Theor Appl Genet*, 102:1273–1279.
- McIntosh, R.A. (1983): A catalogue of gene symbols for wheat. 1197-1255. In S.Sakamoto (ed.) *Proc. Int. Wheat Genet. Symp.*, 6th, Kyoto, Japan. 28 Nov.- 3 Dec. 1983, Plant Germplasm Inst., Kyoto Univ., Kyoto, Japan.
- Merker, A. (1982): Veery a CIMMYT spring wheat with the 1BL/1RS translocation. *Cereal Res. Commun*, 10:105-106.
- Merker, A., Forsstrom, P.O. (2000): Isolation of mildew resistant wheat rye translocation lines from adouble substitution line. *Euphytica*, 115:167-172.
- Mettin, D., Bluthner, D., W.D., Schlegel, G. (1973): Additional evidence on spontaneous 1B/1R wheat-rye substitutions and translocations. *Proceedings of the fourth international wheat genetics symposium. Alien genetic material*: 179-184.
- Miller, T.E., Reader, S.M., Purdie, K.A., Abbo, S., Dunford, R.P., King, I.P. (1995): Fluorescent in situ hybridization as an aid to introducing alien genetic variation into wheat. *Euphytica*, 85: 275-279.
- Mirzaghaderi, G., Zeinali, G., Rafiepour, M., Karimzadeh, G. (2011): Wheat-Rye Translocation in Iranian Brad Wheat Cultivars and Their Ion Distribution in Respons to Salinity Stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13: 1163-1172.
- Mohler, V., Hsam, S.L.K., Zeller, F.J., Wenzel, G. (2001): An STS marker distinguishing te rye-derived powdery mildew resistance alleles at the Pm8/Pm17 locus of common wheat. *Plant breeding*, 120: 448-450.
- Moonen, J.H.E., Zeven, A.C. (1984): SDS – PAGE of the high – molecular – weight subunits of wheat glutenin and the characterization of 1R (1B) substitution and 1BL/1RS translocation lines. *Euphytica*, 33: 3-8.
- Nadella, K., D., Peake, A.S., Bariana, H.S., Cooper, M., Godwin, I., D., Carroll, B.J. (2002): A rapid PCR protocol for marker assisted detection of heterozygotes in segregating generations involving 1BL/1RS translocation and normal wheat lines. *Aust. J. Agric. Res.*, 53:931-938.

- Nagy, E.D., Lelley, T. (2003): Genetic and physical mapping of sequence specific amplified polymorphic (SSAP) markers on the 1RS chromosome arm of rye in a wheat background. *Theoretical and applied genetics*, 107:1271-1277.
- Nagy, E.D., Eder, C., Molnar-Lang, M., Lelley, T. (2003): Genetic mapping of sequence-specific PCR-based markers on the short arm of the 1BL/1RS wheat-rye translocation. *Euphytica*, 132: 243-250.
- Rabinovich, S.V. (1998): Importance of wheat-rye translocation for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. *Euphytica*, 100: 323-340.
- Rahmatov, M. (2012): Isolation and evaluation of different wheat rye translocation lines obtained from a disease resistant double translocation line with 1BL/1RS and 2RL.2BS. The Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Sciences. Master thesis in Biology, Plant Breeding Programme. Alnarp, 2012. Plant breeding and biotechnology.
- Rajaram, S., Ch. E. Mann, G. Ortiz-Ferrara, A. Mujeeb – Kazi (1983): Adaptation, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheats. In: Sakamoto, S. (ed) Proc. 6th IWG Symp., Kyoto, Jpn.,: 613-621.
- Rayburn, A. L., Carver, B.F. (1988): Cytological identification of 1B/1R wheat rye translocations in winter wheat breeding lines. *Euphytica*, 38: 237-240.
- Ren, T.H., Yang, Z.J., Yan, B.J., Zhang, H.Q., Fu, S.L., Ren, Z.L. (2009): Development and characterization of a new 1BL/1RS translocation line with resistance to stripe rust powdery mildew of wheat. *Euphytica*, 69: 207-213.
- Ren, T.H., Chen, F., Yan, B.J., Zhang, H.Q., Ren, Z.L. (2012): Genetic diversity of wheat rye 1BL/1RS translocation lines derived from different wheat and rye sources. *Euphytica*, 183: 133-146.
- Riley, R., Kimber, G. (1966): The transfer of Alien Genetic variation to wheat. In Annual report of the Plant Breeding Institute, Cambridge 6.
- Rogowsky, P. M. K., Shepherd, W., Langridge, P. (1992): Polymerase chain reaction based mapping of rye involved repeated DNA sequences. *Genome*, 35: 621—626.
- Rukavina, I., Marić, S., Guberac, V., Čupić, T., Tepper, C. (2012): Varijabilnost gluteninskih lokusa hrvatske germplazme pšenice. *Poljoprivreda*, 18: 30-35.

- Saal, B., Wricke, G. (1999) : Development of simple sequence repeat markers in rye *Secale cereale* L. *Genome*, 42: 964—972.
- Schlegel, R., Korzun, V. (1997): About the origin of 1RS.1BL wheat-rye chromosome translocation from Germany. *Plant. Breed.*, 116: 537-540.
- Schwarzacher, T., Ananthawat-Jonsson, K., Harriossn, G.E., Islam, A.K.M.R., Jia, J.Z., King, I.P., Leitch, A.R., Miller, T.E., Reader, S.M., Rogers, W.J., Shi, M., Heslop-Harrison, J.S. (1992): Genomic in situ hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 778-786.
- Shimizu, Y., Nasuda, S., Ryu-Endo, T. (1997): Detection of the Sec-1 locus of rye by a PCR based method. *Genes Genet. Syst.*, 72:197-203.
- Singh, N.K., Shepherd, K.W., McIntosh, R.A. (1990): Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rusts and  $\omega$  secalins on the short arm of rye chromosome 1R. *Theor. Appl. Genet.*, 80:609-616.
- Tabibzadeh, N., Karimzadeh, G., Naghavi, M.R. (2013): Distribution of 1AL/1RS and 1BL/1RS wheat rye translocations in iranian wheat using PCR based markers and SDS-PAGE. *Cereal research communications*, 41:1-10.
- Tang, Z.X., Fu, S.L., Ren, Z.L., Zhang, H.Q., Yang, Z.J., Yan, B.J., Zhang, H.Y. (2008): Production of a new wheat cultivar with a different 1B/1R translocation with resistance to powdery mildew and stripe rust. *Cereal research Communications*, 36: 451-460.
- Tiwari, R., Priyamvada, Singh, R., Nainawatee, H.S., Kumar, R., Tyagi, B.S., Gupta, R.K., Nagrajan, S. (2002): Marker assisted detection of gene (1Dx5) and translocation (1B/1R) in wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40: 309-313.
- Vaillancourt, A., Nkongolo, K.K., Michael, P., Mehes, M. (2008): Identification, characterisation and chromosome locations of rye and wheat specific ISSR and SCAR markers useful for breeding purposes. *Euphytica*, 159: 297-306.
- Villareal, R.L., Rajaram, S., Mujeeb-Kazi, A., Del Toro, E. (1991): The effect of chromosome 1B/1R translocation on the yield potential of certain spring wheats (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding*, 106:77-81.

- Villareal, R.L., Mujeeb-Kazi, A., Rajaram, S., del Toro, E. (1994): Associated effects of chromosome 1B/1R translocation in agronomic traits in hexaploid wheat. *Breeding science*, 44: 7-11.
- Villareal, R.L., Banuelos, O., Mujeeb-Kazi, A., Rajaram, S. (1998): Agronomic performance of chromosomes 1B and T1BL/1RS near-isolines in the spring bread wheat Seri M82. *Euphytica*, 103: 195-202.
- Weng, Y., Azhaguvel, P., Devkota, R.N., Rudd, J.C. (2007): PCR based markers for detection of different sources of 1AL/1RS and 1BL/1RS wheat-rye translocations in wheat background. *Plant Breeding*, 126: 482-486.
- Wieser, H., Kieffer, R., Lelley, T. (2000): The influence of 1B/1R chromosome translocation on gluten protein composition and technological properties of bread wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1640-1647.
- Yediay, F.E., Baloch, F.S., Kilian, B., Ozkan, H. (2010): Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL.RS and 1BL.RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57: 119-129.
- Zhang, P., Friebe, B., Lukaszewski, A.J., Gill, B.S. (2001): The centromere structure in Robertsonian wheat rye translocation chromosomes indicates that centric breakage fusion can occur at different positions within the primary constriction. *Chromosoma*, 110: 335-344.
- Zhang, P., He, Z., Chen, D., Zhang, Y., Larroque, R., Xia, X. (2007): Contribution of common wheat protein fractions to dough properties and quality of northern style Chinese steamed bread. *Journal of cereal science*, 46: 1-10.
- Zhao, C., Cui, F., Zong, H., Wang, Y., Bao, Y., Hao, Y., Wang, H. (2009): Transmission of the chromosome 1R in winter wheat germplasm Aimengniu and its derivatives revealed by molecular markers. *Agricultural Sciences in China*, 8: 652-657.
- Zheng, S., Byrne, P.F., Bai, G., Shan, X., Reid, S.D., Haley, S.D., Seabourn, B.W. (2009): Association analysis reveals effect of wheat glutenin alleles and rye translocations on dough mixing properties. *Journal of cereal science*, 50: 283-290.



<http://faostat.fao.org/>

<http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/>

<http://maswheat.ucdavis.edu/>

<http://wheatpedigree.net/>

## 8. Sažetak

Translokacija između kratkog kraka kromosoma 1R raži i dugog kraka kromosoma 1B pšenice predstavlja praktično najzastupljenije unesene strane gene u genom heksaploidne pšenice. 1RS krak kromosoma predstavlja izvor različitih korisnih gena, koji se povezuju sa povećanom otpornošću na bolesti, povećanom adaptabilnosti, tolerantnosti na stres te povećanom stabilnošću i visinom prinosa. S druge strane translokaciju se povezuje i sa lošom tehnološkom kvalitetom pšenice, kao posljedicom prisutnosti sekalina i smanjenja broja glutenskih lokusa. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi zastupljenost 1B/1R translokacije u hrvatskom sortimentu ozime pšenice korištenjem molekularnih markera. U istraživanje je bilo uključeno 40 kultivara pšenice od čega 23 hrvatska kultivara. Za identifikaciju translokacije korištena su četiri para početnica: RIS, SCM9, RYE-NOR i PAW161. Istraživanjem je utvrđena prisutnost translokacije u 12 od 40 (30%) ispitivanih kultivara, dok je među hrvatskim kultivarima pšenice translokaciju imalo 8 od 23 (34.78%) kultivara (Zlatna Dolina, Barbara, Nova Žitarka, Marija, Prima, Kuna, Koleda i Dea).

## 9. Summary

The translocation between the short arm of chromosome 1R of rye and the long arm of chromosome 1B of wheat represents practically the most common introduced foreign genes into the genome of hexaploid wheat. 1RS chromosome arm represents a source of different useful genes, which are associated with increased disease resistance, improved adaptability, tolerance to stress, and increased stability and level of yield. On the other hand translocation is associated with poor technological quality of wheat as a result of the presence of secalin and reduced number of gluten loci. The aim of this study was to determine the prevalence of 1B/1R translocation among Croatian winter wheat varieties using molecular markers. The study included 40 varieties of which 23 Croatian. For determination of translocation, four pairs of primers were used: RIS, SCM9, RYE-NOR and PAW161. The presence of translocation was determined in 12 of 40 (30%) varieties, while among Croatian wheat varieties translocation had 8 of 23 (34.78%) varieties (Zlatna Dolina, Barbara, Nova Žitarka, Marija, Prima, Kuna, Koleda i Dea).

## 10. Popis tablica

Br.	Naziv tablice	Str.
Tablica 1.	Rodoslovlje, godina priznavanja i podrijetlo hrvatskih kultivara pšenice	14
Tablica 2.	Rodoslovlje, godina priznavanja i podrijetlo stranih kultivara pšenice	15
Tablica 3.	Godina priznavanja i podrijetlo kultivara raži	16
Tablica 4.	Koncentracije DNA i PCR razrjeđenja	20
Tablica 5.	Sekvence korištenih početnica	21
Tablica 6.	Razrjeđenja početnica	21
Tablica 7.	Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR amplifikaciju RIS i RYE-NOR početnica	22
Tablica 8.	PCR program za RIS i RYE-NOR početnice	22
Tablica 9.	Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR amplifikaciju SCM9 početnica	23
Tablica 10.	PCR program za SCM9 početnice	24
Tablica 11.	Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za PCR amplifikaciju PAW161 početnica	24
Tablica 12.	PCR program za PAW161 početnice	25
Tablica 13.	Prisutnost translokacije utvrđena različitim molekularnim markerima	28

## 11. Popis slika

Br.	Naziv slike	Str.
Slika 1.	Sjeme posijano u tresetne tablete (foto original; S. Guberac)	16
Slika 2.	Vodena kupelj za inkubaciju tubica (foto original; S. Guberac)	17
Slika 3.	Uzorci na stalku za mućkanje (foto original; S. Guberac)	18
Slika 4.	Centrifugiranje uzoraka (foto original; S. Guberac)	18
Slika 5.	Uzorci u uređaju za PCR analizu (foto original; S. Guberac)	23
Slika 6.	Kadica s agaroznim gelom (foto original; S. Guberac)	26
Slika 7.	Elektroforeza PCR produkata (foto original; S. Guberac)	26
Slika 8.	Uređaj za snimanje gela - G:BOX F3 (foto original; S. Guberac)	27
Slika 9.	Produkti amplifikacije RIS početnica (foto original; S. Guberac)	29
Slika 10.	Produkti amplifikacije SCM9 početnica (foto original; S. Guberac)	29
Slika 11.	Produkti amplifikacije RYE-NOR početnica (foto original; S. Guberac)	30
Slika 12.	Produkti amplifikacije PAW161 početnica (foto original; S. Guberac)	31

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

### 1B/1R translokacija u hrvatskom sortimentu ozime pšenice

Sunčica Guberac

**Sažetak:** Translokacija između kratkog kraka kromosoma 1R raži i dugog kraka kromosoma 1B pšenice predstavlja praktično najzastupljenije unesene strane gene u genom heksaploidne pšenice. 1RS krak kromosoma predstavlja izvor različitih korisnih gena, koji se povezuju sa povećanom otpornošću na bolesti, povećanom adaptabilnosti, tolerantnosti na stres te povećanom stabilnošću i visinom prinosa. S druge strane translokaciju se povezuje i sa lošom tehnološkom kvalitetom pšenice, kao posljedicom prisutnosti sekalina i smanjenja broja glutenskih lokusa. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi zastupljenost 1B/1R translokacije u hrvatskom sortimentu ozime pšenice korištenjem molekularnih markera. U istraživanje je bilo uključeno 40 kultivara pšenice od čega 23 hrvatska kultivara. Za identifikaciju translokacije korištena su četiri para početnica: RIS, SCM9, RYE-NOR i PAW161. Istraživanjem je utvrđena prisutnost translokacije u 12 od 40 (30%) ispitivanih kultivara, dok je među hrvatskim kultivarima pšenice translokaciju imalo 8 od 23 (34.78%) kultivara (Zlatna Dolina, Barbara, Nova Žitarka, Marija, Prima, Kuna, Koleda i Dea).

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

**Mentor:** prof.dr.sc. Sonja Marić

**Broj stranica:** 50

**Broj grafikona i slika:** 12

**Broj tablica:** 13

**Broj literaturnih navoda:** 90

**Broj priloga:**

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** pšenica, raž, translokacija, molekularni marker

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Milutin Bede, predsjednik
2. prof. dr. sc. Sonja Marić, mentor
3. doc. dr. sc. Sonja Petrović, član

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

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

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

**Graduate thesis**

### **1B/1R translocation in croatian winter wheat varieties**

**Sunčica Guberac**

**Abstract:** The translocation between the short arm of chromosome 1R of rye and the long arm of chromosome 1B of wheat represents practically the most common introduced foreign genes into the genome of hexaploid wheat. 1RS chromosome arm represents a source of different useful genes, which are associated with increased disease resistance, improved adaptability, tolerance to stress, and increased stability and level of yield. On the other hand, translocation is associated with poor technological quality of wheat as a result of the presence of secalin and reduced number of gluten loci. The aim of this study was to determine the prevalence of 1B/1R translocation among Croatian winter wheat varieties using molecular markers. The study included 40 varieties of which 23 Croatian. For determination of translocation, four pairs of primers were used: RIS, SCM9, RYE-NOR and PAW161. The presence of translocation was determined in 12 of 40 (30%) varieties, while among Croatian wheat varieties translocation had 8 of 23 (34.78%) varieties (Zlatna Dolina, Barbara, Nova Žitarka, Marija, Prima, Kuna, Koleda i Dea).

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

**Mentor:** prof.dr.sc. Sonja Marić

**Number of pages:** 50

**Number of figures:** 12

**Number of tables:** 13

**Number of references:** 90

**Number of appendices:**

**Original in:** Croatian

**Key words:** wheat, rye, translocation, molecular marker

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

1. prof. dr. sc. Milutin Bede, chairman
2. prof. dr. sc. Sonja Marić, mentor
3. doc. dr. sc. Sonja Petrović, member

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