

ANALIZA PROTEINA U SEMENU PŠENICE (*Triticum aestivum* L.)

Desimir Knežević¹, Aleksandar Paunović², Pavle Mašković²,
Mirjana Menkovska³, Danijela Kondić⁴, Milica Zelenika², Milomirka Madić²,
Vesna Djurović², Veselinka Zečević⁵

Izvod: Proteini u semenu pšenice imaju glavnu ulogu u formiranju kvaliteta pšenice. Cilj rada je izučavanje varijabilnosti kompozicije genskih alela za glijadine i glutenine, sadržaja ukupnih proteina i sadržaja suvog glutena kod genotipova hlebne pšenice. Za ovo izučavanje je korišćeno seme 10 genotipova hlebne pšenice gajene u dve godine sa različitim vremenskim uslovima. Rezultati istraživanja su pokazali razlike između sorti prema kompoziciji glijadina i glutenina, kao i prema dobijenim vrednostima za sadržaj proteina i sadržaj glutena. Na tri lokusa za visokomolekularne glutenine (*Glu-1*) je identifikovano devet alela, a na šest lokusa za glijadine je identifikovano ukupno 29 alela i to 13 alela na tri lokusa *Gli-1* i 16 alela na tri lokusa *Gli-2*. Sastav glijadinskih alela je bio različit kod izučavanih genotipova pšenice, dok je sastav gluteninskih alela bio isti (*b, c, d*) kod tri genotipa (G-3539/03, Poljana i G-3602/03) a kod ostalih sedam sorti je bio različit. Sadržaj proteina je varirao zavisno od genotipa i od godine eksperimenta i to od 11,60% (G-3602/03 u prvoj godini) do 15,00% (G-3539/03 u drugoj godini). Sadržaj suvog glutena je varirao od 10,018% (G-3602/03 u prvoj godini) do 14,0860% (G-3539/03 u drugoj godini istraživanja). Kod izučavanih genotipova pšenice je ustanovljena heterogenost *Glu-A1* lokusa (kod G-3908/03) i *Glu-B1* lokusa (G-3602/03), kao i heterogenost *Gli-A1* lokusa (G-3504/03 i G-3532/03), *Gli-D1* lokusa (G-3908/03) i *Gli-A2* lokusa (G-3908/03 i Žitnica). Kompozicija alela je bila ista u obe godine kod svih 10 genotipova, a sadržaj proteina i glutena je varirao, čije vrednosti su bile veće u drugoj godini eksperimenta.

Ključne reči: pšenica, aleli, proteini, gluten, kvalitet, oplemenjivanje

Uvod

Variranje sadržaja i sastava proteina utiče na formiranje tehnološkog i nutritivnog kvaliteta semena i proizvoda od pšenice. Sinteza proteina se nalazi pod kontrolom genetičkih faktora, pod uticajem agroekoloških faktora kao i njihove interakcije (Altenbach, 2012). Proteini deponovani u endospermu semena su različite molekulske mase i hemijske strukture, razvrstani u četiri grupe albumini, globulini, glijadini i glutenini. U proseku kod pšenice sadržaj proteina varira u rasponu od 8-16%, od čega oko 80% čine glijadini i glutenini u približno jednakom kvantitetu (Shewry i sar., 2002),

¹Univerzitet u Prištini, Poljoprivredni fakultet, Kosovska Mitrovica -Lešak, Kopaonička bb, 38219 Lešak, Kosovo i Metohija, Srbija, e-adresa:deskoa@ptt.rs

²Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, Čačak, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Srbija;

³Univerzitet Čirilo i Metodije, Institut za stočarstvo, Departman Tehnologija hrane i Biotehnologija, Skopje, Makedonija

⁴Univerzitet u Banja Luci, Poljoprivredni fakultet, Banja Luka, Bulevar Vojvode Petra Bojovića 1A, 78000 Banja Luka, Republika Srpska Bosna i Hercegovina

⁵Univerzitet Megatrend, Beograd, Fakultet za biofarming, Bačka Topola, Marsala Tita 2, Srbija

koji su sastavne komponente glutena. Glijadini se nalaze pod kontrolom alela sa *Gli-1* i *Gli-2* lokusa koji se nalaze na kratkim kracima hromozoma 1. i hromozoma 6. ABD genoma, a visokomolekularni glutenini su pod kontrolom *Glu-1* koji se nalaze na dugim kracima hromozoma 1. ABD genoma (Sozinov i Popereya, 1980). Na svim lokusima je ustanovljen multipli alelizam, što doprinosi genetičkoj varijabilnosti (Metakovsky i sar. 1991). Podjedinice glijadina i glutenina se razlikuju u zavisnosti od alela pod čijom su kontrolom, i imaju različit doprinos formiranju tehnološkog kvaliteta. Takođe se razlikuju prema aminokiselinskom sastavu. Komponente glijadina i glutenina imaju visok sadržaj aminokiselina prolina oko 20% i glutaminske kiseline. Glijadini i glutenini su glutenski proteini čija proporcija sadržaja varira u zavisnosti od faktora spoljašnje sredine i genetičke kontrole (Hurkman i sar., 2011). Gluten predstavlja kompleks proteina, lipida i ugljenohidrata koji se formira uspostavljanjem kovalentnih i nekovalentnih interakcija između komponenti brašna u zamesu testa (Békés, 2012). Gluten bubri u kontaktu sa vodom, nastaje mrežasta struktura pri uspostavljanju disulfidnih i vodoničnih veza, hidrofobnog karaktera što doprinosi većoj elastičnosti testa. Sadržaj proteina glutena, zavisi od temperature, padavina, kao i doze i načina primene azotnih đubriva u toku vegetacionog razvića, a posebno u periodu posle cvetanja, u fazi nalivanja zrna (Knežević i sar. 2017). Na sadržaj proteinskih komponenti glutena utiče način, doza ishrane azotom, kao i visoke temperature koje izazivaju prekid sinteze skroba, a povećava se sadržaj glutena (Moldestad i sar., 2011).

Cilj rada je izučavanje varijabilnosti kompozicije genskih alela za glijadine i glutenine, sadržaja ukupnih proteina i sadržaj suvog glutena kod genotipova hlebne pšenice, kao i povezanost alela sa sadržajem proteina i glutena.

Materijal i metode rada

Seme 10 genotipova pšenice je korišćeno u analizi kompozicije glijadina i visokomolekularnih glutenina. Ekstrakcija glijadina i glutenina je uradjena prema metodi (Sozinov i Popereya, 1980). Seme za ocenu osobina tehnološkog kvaliteta je dobijeno u dve godine istraživanja na oglednom polju Centra za strna žita Kragujevac. Identifikacija *Gli-1* i *Gli-2* alela je vršena analizom elektrograma dobijenim na gelu na kojima su razdvojene komponente glijadina metodom acid PAG elektroforeze (pH=3.1) prema Metakovsky i sar. (1991) a identifikacija *Glu-1* alela je uradjena na gluteninskih podjedinica korišćenjem SDS PAG elektroforeze (pH=8.9) prema (Payne, 1987). Sadržaj proteina u semenu je određen metodom Kjeldahl ($N \times 5.7$). Sadržaj glutena je određen ispiranjem testa sa 2% slanim rastvorom, koji je osušen i izmeren na tehničkoj vagi, čija vrednost u proporciji sa polaznom masom uzorka predstavlja procentualni udeo suvog glutena.

Vremenski uslovi u toku eksperimenta

U toku dve godine eksperimenta postojale su razlike u variranju prosečnih vrednosti temperature i padavina, a koje su se razlikovale u odnosu na prosečne vrednosti u toku desetogodišnjeg perioda (tab. 1).

Tokom vegetacionog perioda prosečna temperatura je bila 8.3°C u prvoj godini, koja je značajno manja nego u drugoj godini - 11.0 °C, a približna prosečnoj vrednosti

za deset godina. Medjutim, prosečna količina padavina je bila 533,7mm u prvoj godini i značajno veća nego u drugoj -369,9mm, kao i od prosečne vrednosti za deset godina 417,8mm. Povoljniji režim temperature i padavina je bio u prvoj godini gajenja.

Tabela 1. Prosečne mesečne temperature i ukupna mesečna količina padavina
 Table 1. Monthly and mean temperatures and monthly and cumulative precipitation

Tem& Precept	Period	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Xm	Total
°C	2005/06	11,5	5,6	3,3	-1,7	1,5	5,5	12,7	16,4	19,7	8,3	/
°C	2006/07	13,3	7,6	3,5	6,1	6,3	9,1	12,1	18,2	22,8	11,0	/
	2000-2010	11,8	6,4	1,7	-0,1	2,6	5,9	11,6	16,4	20,4	8,5	/
(mm)	2005/06	49,0	54,8	47,1	27,9	38,1	116,0	86,3	29,6	84,8	59,3	533,7
(mm)	2006/07	16,7	13,7	51,9	45,3	32,1	62,9	3,6	118,0	25,3	41,1	369,9
	2000-2010	61,0	44,3	44,6	30,0	29,9	33,2	52,9	52,6	69,3	46,4	417,8

Rezultati istraživanja i diskusija

Kod izučavanih genotipova pšenice ustanovljena je različita kompozicija podjedinica glutenina i glijadina, odnosno alele koji kontrolišu njihovu sintezu. Takodje su nadjene različite vrednosti sadržaja sirovih proteina i glutena kod izučavanih genotipova pšenice.

Ustanovljena je polimorfnost *Glu-1* lokusa za glutenine kao i polimorfnost *Gli-1* i *Gli-2* lokusa za glijadine. U analizi deset genotipova pšenice, na tri lokusa *Glu-1* je determinisano devet alela i to tri na *Glu-A1* (*a, b, c*), četiti na *Glu-B1* (*b, c, i, u*) i dva alela na *Glu-D1* (*a, d*). Kod genotipova je determinisano osam različitih kombinacija podjedinica glutenina i odgovarajućih alela koji imaju kontrolu njihove sinteze, pri čemu su tri genotipa (G-3539/03, Poljana i G-3602/03) imali istu kombinaciju alela (*b, c, d*) koji kontrolišu sintezu gluteninskih podjedinica (2*, 7*9, 5*10). Identifikovani aleli su bili prisutni kod različitog broja sorti, što ukazuje na njihovu učestalost. Analizirano po lokusima, nadjena je najveća učestalost za *Glu-A1b* (50%), *Glu-B1c* (50%) *Glu-D1a* (60%) a najmanja za *Glu-A1a* (10%), *Glu-B1u* i *Glu-B1i* (10%) *Glu-D1d* (40%) tab. 2.

Kompozicija glijadinskih alela je bila različita kod izučavanih 10 genotipova pšenice. Na šest lokusa za glijadine identifikovano je 29 različitih alela i to: četiri alela na *Gli-A1* lokusu (*a, b, f, g*), na *Gli-B1* (*b, e, g, l*), na *Gli-D1* (*a, b, d, f, k*), na *Gli-A2* lokusu (*b, c, e, g, f, k*), na *Gli-B2* (*b, c, p, s*), na *Gli-D2* (*a, b, h, j, q, t*). Identifikovani aleli su bili prisutni kod različitog broja sorti. Aleli *Gli-A1b* i *Gli-A1f* su bili prisutni kod po tri genotipa (30%) a ostala dva alela (*a, g*) sa ovog lokusa su prisutna kod po dve sorte. Najveća učestalost sa ostalih lokusa je bila *Gli-B1l* (40%), *Gli-D1b* (30%), *Gli-A2b* (30%), *Gli-B2b* (500%), kao i *Gli-D2a*, *Gli-D2b* alela, oba po 30%. Ostali aleli na lokusima su imali učestalost od 10% do 20% (tab. 3).

Kod izučavanih genotipova pšenice je ustanovljena heterogenost za lokuse. Kod G-3908/03 na lokusu *Glu-A1* nadjeno prisustvo alela (*b/a*) koji kontrolišu sintezu podjedinica 2*/1, kod G-3602/03 na lokusu *Glu-B1* su nađeni aleli (*b/c*) koji kodiraju subjedinice 7*+8/7*+9. Ustanovljena je heterogenost lokusa *Gli-A1* (*g+a*) kod G-3504/03 i G-3532/03, na lokusu *Gli-D1* (*b+a*) kod G-3908/03 i na lokusu *Gli-A2* (*b+j*) kod G-3908/03 i (*g+b*) kod sorte Žitnica (tab. 2).

Tabela 2. Variranje kompozicije alela na *Glu-1* i *Gli-1*, *Gli-2* lokusima, sadržaja proteina i sadržaja glutena kod genotipova pšenice u različitim uslovima gajenja
 Table 2. Variation of allele composition at *Glu-1* and *Gli-1*, *Gli-2* loci, content of proteins and content of gluten in wheat genotypes under different growing conditions

Cultivar	Glutenin components			<i>Glu-1</i> alleles			<i>Gli-1</i> alleles			<i>Gli-2</i> alleles			Quality traits of seed 2014/15		Quality traits of seed 2015/16	
	A1	B1	D1	A1	B1	D1	A1	B1	D1	A2	B2	D2	Protein content %	Dry gluten %	Protein content %	Dry gluten %
G-3928/03	2*	7+8	2+12	b	u	a	f	g	b	h	s	b	11,80	10,981	12,20	11,625
Bečejka	null	7+9	2+12	c	c	a	f	l	f	e	b	a	13,40	13,163	13,80	13,392
G-3504/03	null	7+8	2+12	c	b	a	g+a	b	b	f	c	q	12,20	12,127	13,00	12,446
G-3532/03	2*	17+18	2+12	b	i	a	g+a	b	f	c	c	t	12,60	12,442	12,90	12,771
G-3539/03	2*	7+9	5+10	b	c	d	b	e	b	b	b	b	14,30	13,745	15,00	14,086
G-3909/03	null	7+8	5+10	c	b	d	b	l	a?	f	b	a	12,35	10,748	13,20	11,042
Poljana	2*	7+9	5+10	b	c	d	a	l	d	b	?	a	14,00	12,946	14,40	13,588
G-3602/03	null	7+8/ 7+9	2+12	c	b/c	a	a	l	f	g	b	j	11,60	10,018	12,00	10,435
G-3908/03	2*/1	7+9	5+10	b/a	c	d	f	e	b+a	b+j	b	h	13,60	11,612	14,20	11,189
Žitnica	1	7+9	2+12	a	c	a	b	g	k	g+b	p	b	12,85	11,339	13,60	12,688

Polimorfizam *Gli-1* i *Gli-2* alela je nadjen u istraživanjima (Djukić i sar., 2011; Knežević i sar., 2017), kao i *Glu-1* alela (Menkovska i sar., 2002).

Sadržaj proteina je varirao zavisno od genotipa i od godine, čije vrednosti su bile u rasponu od 11,60% (G-3602/03) do 14,30% (G-3539/03) u prvoj godini i od 12,00% (G-3602/03) do 15,00% (G-3539/03) u drugoj godini. Sadržaj suvog glutena je varirao od 10,018% (G-3602/03) do 13,745% (G-3539/03) u prvoj godini i od 10,435% (G-3602/03) do 14,0860% (G-3539/03) u drugoj godini istraživanja (tab. 2).

Tabela 3. Učestalost HMW GS i *Glu-1*, *Gli-1* i *Gli-2* alela kod genotipova pšenice
 Table 3. Frequency of HMW GS and alleles at *Glu-1*, *Gli-1* and *Gli-2* loci in wheat

<i>Glu-A1</i>			<i>Glu-B1</i>			<i>Glu-D1</i>			<i>Gli-A1</i>		<i>Gli-B1</i>		<i>Gli-D1</i>		<i>Gli-A2</i>		<i>Gli-B2</i>		<i>Gli-D2</i>	
sub units	allele	%	sub units	allele	%	sub units	allele	%	allele	%	allele	%	allele	%	allele	%	allele	%	allele	%
1	a	10	7+8	b	30	2+12	a	60	a	20	b	20	b	40	b	30	b	50	b	30
2*	b	50	7+9	c	50	5+10	d	40	f	30	l	40	a	10	g	20	e	20	a	30
null	c	40	17+18	i	10				b	30	g	20	k	10	e	10	s	10	q	10
			7+8	u	10				g	20	e	20	f	30	c	10	p	10	t	10
													d	10	g	20	?	10	j	10
														h	10				h	10

Gluten je kompleks glijadina i glutenina, čiji sastav, sadržaj i proporcija sadržaja određuje osobine tehnološkog kvaliteta semena pšenice i gotovih proizvoda. Glijadini imaju pozitivnu vezu sa povećanjem viskoznosti i elastičnosti testa, a glutenini sa većom elastičnosti glutena (Wrigley et al., 2006).

Variiranje vrednosti sadržaja proteina (Abedi i sar., 2011), kao i sadržaja glutena zavisi od genetičkih faktora, (Knežević i sar., 2017) faktora spoljašnje sredine i interakcije genotipa i faktora spoljašnje sredine (Zečević i sar., 2009). Temperatura je značajan faktor u rastu i razviću biljke, tako da optimalna vrednost za razvoj biljke pšenice je oko 16°C, dok značajno povišene temperature utiču na ubrzano sazrevanje, sadržaj i sastav glutena, kao i na kvalitet testa (Moldestad i sar., 2011).

Zaključak

Izučavani genotipovi pšenice su se razlikovale prema kompoziciji HMW glutenina i glijadina za čije genske lokuse je ustanovljena polimorfnost. Tri genotipa su imala istu kombinaciju *Glu*-alela (*b*, *c*, *d*, kod G-3539/03, Poljana, G-3908/03), a kod svih 10 genotipova je bila različita kombinacija *Gli*- alela. Genotipovi koji su bili nosioci alela *Glu-A1b* za podjedinicu 2*, *Glu-B1b* za podjedinice 7+8, *Glu-D1d* za podjedinice 5+10 su imali pozitivnu povezanost sa sadržajem proteina i glutena. Najveći sadržaj proteina (14,30% u prvoj i 15,00% u drugoj godini) i glutena (13,745% u prvoj i 14,086% u drugoj godini) je nađen kod genotipa G-3539/03. Najmanji sadržaj proteina i glutena je nađen kod G-3620/03 kod kojeg je bila kombinacija *Glu-I* alela (*c*, *b*, *a*, sa podjedinicama - null, 7*+8, 2+12), koji može biti pogodan za ishranu imunosenzitivnih osoba na gluten.

Napomena

Istraživanja su deo projekta TR 31092 „Izučavanje genetičke osnove poboljšanja prinosa i kvaliteta strnih žita u različitim ekološkim uslovima”, koji finansira Ministarstvo Prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

Literatura

- Abedi, T., Alemzadeh, A., Kazemeini, A. S. (2011): Wheat yield and grain protein response to nitrogen amount and timing. [Australian Journal of Crop Science](#), 5: 330-336.
- Altenbach, S. B. (2012): New insights into the effects of high temperature, drought and post-anthesis fertilizer on wheat grain development. *J. Cereal Science*, 56:39-50.
- Altenbach, S. B. (2012): New insights into the effects of high temperature, drought and post-anthesis fertilizer on wheat grain development. *J. Cereal Science*, 56:39-50.
- Békés, F. (2012): New Aspects in Quality Related Wheat Research:1. Challenges and Achievements. *Cereal Research Communications*, 40: 159–184.
- Djukić, N., Knežević, D., Horvat, D., Živančev, D., Torbica, A. (2011). Similarity of cultivars of wheat (*Tr. durum*) on the basis of composition of gliadin alleles. *Genetika*. 43 (3):527-536.
- Hurkman, W. J., Wood, D. F. (2011). High temperature during grain fill alters the morphology of protein and starch deposits in the starchy endosperm cells of developing wheat (*Tr. aestivum* L.) grain. *J.Agric.&Food Chem.* 59: 4938-4946.

- Knezevic, D., Rosandic, A., Kondic, D., Radosavac, A., Rajkovic, D. (2017): Effect of gluten formation on wheat quality. *Columella – Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 4. (1):169-174.
- Menkovska, M., Knežević, D., Ivanoski, M. (2002): Protein allelic composition, dough rheology, and baking characteristics of flour mill streams from wheat cultivars with known and varied baking qualities. *Cereal Chemistry*. 79 (5):720-725.
- Metakovsky, E. V., Knežević, D., Javornik Branka (1991): Gliadin allele composition of Yugoslav winter wheat cultivars. *Euphytica*. 54:285-295.
- Moldestad, A., Mosleth F., E., Hoel, B., Skjelvag, A. O., Uhlen, A.K.(2011):Effect of temperature variation during grain filling on wheat gluten resistance. *J. Cer. Sci.*, 53: 347-354.
- Payne, P. (1987): Genetics of wheat storage proteins and effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann.Rev.Plants Physiol.*, 38:141-153.
- Sozinov, A.A., Popereya F.A. (1980): Genetic Classification of Prolamins and Its Use for Plant Breeding. *Annales de Technologie Agricole*, 28, 229-245.
- Shewry, P. R. (2007): Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science*, 46: 239 – 250.
- Zečević, V., Knežević, D., Bošković, J., Madić, M. (2009): Effect of genotype and environment on wheat quality. *Genetika*, 41: 247 -253.
- Wrigley, C.W., Bekes, F., Bushuk, W. (2006). Gluten: a balance of gliadin and glutenin. In: Wrigley C, Bekes F, Bushuk W (eds) *Gliadin and glutenin. The unique balance of wheat quality*. AACCC Int Press, St Paul, pp. 3–32

ANALYSIS OF PROTEIN IN SEED OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

*Desimir Knežević¹, Aleksandar Paunović², Pavle Mašković²,
Mirjana Menkovska³, Danijela Kondić⁴, Milica Zelenika², Milomirka Madić²,
Vesna Djurović², Veselinka Zečević³*

Abstract

The protein in seed of wheat play a major role in determining the quality of wheat. The aim is to study the variability of the composition of the gene alleles of gliadins, and the glutenin content, total protein content and dry gluten in bread wheat genotypes. For this study were used seed of bread wheat genotypes grown in two years with different weather conditions. The results showed differences between varieties according to the composition of gliadin and glutenin, and according to the obtained values for the

¹University of Priština, Faculty of Agriculture, Kosovska Mitrovica - Lesak, Kopaonicka bb, 38219 Lesak, Kosovo and Metohija, Serbia, e-adresa:deskoa@ptt.rs

²University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia

³Ss. Cyril and Methodius University, Inst.of Animal Sci., Dept. Food Techn.&Biotechn, Skopje, Macedonia

⁴University of Banja Luci, Faculty of Agriculture, Banja Luka, Bulevar Vojvode Petra Bojovića 1A, 78000 Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

⁵University John Naissbit, Belgrade, Faculty for Biopharming, Bačka Topola, Marsala Tita 2, Serbia.

content of protein and gluten content. At the three *Glu-1* loci were identified nine alleles, while at the three *Gli-1* loci 13 alleles and at the three *Gli-2* loci were identified 16 alleles. Composition of identified alleles was different in the wheat genotypes, and composition of glutenin alleles was specific for seven genotypes while three genotypes (G-3539/03, Poljana and G-3602/03) possessed the same allele (*b*, *c*, *d*). The protein and gluten content is varied depending on the genotype and environmental factors, The genotypes G-3602/03 had the lowest contents of protein 11,6% and gluten 10.018, while G-3539/03 had the highest content of protein 15.00% and dry gluten 14.086% in both years of experiment. Varying the content and composition of proteins is correlated with the properties of wheat quality.

Key words: wheat, alleles, proteins, quality, breeding