

Identifikacija Dreb-B1 lokusa u genotipovima vrsta *Triticum spelta* L. i *Triticum aestivum* L.

Tomić, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:074663>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-05**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Filip Tomić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

**Identifikacija *Dreb-B1* lokusa u genotipovima vrsta *Triticum spelta* L. i
Triticum aestivum L.**

Završni rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Filip Tomić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

**Identifikacija *Dreb-B1* lokusa u genotipovima vrsta *Triticum spelta* L. i
Triticum aestivum L.**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila, član
3. doc.dr.sc. Sunčica Kujunždić, član

Osijek, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivrede, smjer Bilinogojstvo
Filip Tomić

Završni rad

Identifikacija *Dreb-B1* lokusa u genotipovima vrsta *Triticum spelta* L. i *Triticum aestivum* L.

Sažetak:

Povećanjem svjetske populacije povećava se potreba za proizvodnjom visokorodnih kultivara koji će zadovoljiti potrebe za hranom. Proizvodnja uvelike ovisi o abiotičkim čimbenicima te je često podvrgnuta stresnim uvjetima. Tijekom stresnih uvjeta DREB skupina proteina reagira ekspresijom mnogih gena čime se postiže poboljšana tolerancija na stresne uvjete poput suše, povećane količine soli te niskih temperatura. U istraživanju je sudjelovalo 13 genotipova iz vrsta *Triticum* gdje je bio cilj utvrditi prisutnost *Dreb-B1* lokusa. Uspješno je izolirana DNA odgovarajuće čistoće i kvalitete, A260/A280 omjerom apsorbancija od 1,8 do 1,88. Provedena je PCR reakcija s početnicama P18R i P18L koje su specifične za *Dreb-B1* gen koji se nalazi na 3B kromosomu pšenice.

Utvrđena je prisutnost specifičnog alela koji karakterizira prisutnost *Dreb-B1* gena kod četiri uzorka: *T. diccoides*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum* te kultivara Indigo. Nedostatak specifičnog alela na kromosomu 3B uočen je u šest genotipova: *T. monococcum*, *T. compactum*, te u kultivara Nirvana, Bc Tena, Moskva 40 i Sirban prolifik. Od ispitivanih 13 uzoraka na jednom uzorku, *T. diccoides* (SLO), nije zabilježena amplifikacija.

Glavne riječi: PCR, *Dreb-B1*, abiotički stres, suša

21 stranica, 3 tablice, 13 slika, 20 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production
Filip Tomić

BSc Thesis

Identification of *Dreb-B1* loci in *Triticum spelta* L. and *Triticum aestivum* L. genotypes

Summary:

Increasing the world's population increases the need for the production of high -growing cultivars that will meet food needs. Production depends largely on the abiotic factors and is often confirmed by stressful conditions. During stressful conditions, the DREB groups of protein respond to the expression of many genes, which achieves improved tolerance to stressful conditions such as drought, increased amounts of salt and low temperatures. The research was conducted on 13 genotypes from *Triticum* species, where it aimed to determine the presence of the *Dreb-B1* locus. The DNA isolation was successfully isolated, with A260/A280 ratio 1.8 - 1.88. PCR reaction was carried out with SSRs P18R and P18L specific to the *Dreb-B1* gene located on wheat chromosome 3B. The presence of a specific allele of *Dreb-B1* gene was identified in four samples: *T. diccoides*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum* and Indigo. Lack of the specific allele on chromosome 3B was observed in six genotypes: *T. monococcum*, Nirvana, *T. compactum*, BC Tena, Moskva 40 and Sirban Prolifik. From the 13 samples tested, amplification was not successfully implemented in *T. diccoides*.

Key words: PCR, *Dreb-B1*, abiotic stress, drought

21 pages, 3 tables, 13 figures, 20 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	MATERIJAL I METODE	3
2.1.	Biljni materijal.....	3
2.2.	Uzgoj klijanaca	5
2.3.	Izolacija genomske DNA.....	6
2.4.	Priprema PCR reakcije za identifikaciju <i>Dreb-B1</i> gena.....	11
2.5.	Detekcija mikrosatelitnih početnica elektroforezom	13
3.	REZULTATI I RASPRAVA	16
4.	ZAKLJUČAK	19
5.	LITERATURA	20

1. UVOD

Pšenica je najznačajniji ratarski usjev i jedna od najrasprostranjenijih žitarica u svijetu, a uzgaja se na oko 215 milijuna hektara. Kao najznačajniju ulogu pšenica ima u ishrani ljudi za proizvodnju kruha i tjestenine, škroba, ulja iz klica, glutena, a upotrebljava se i u farmaceutskoj i pivarskoj industriji te za ishranu stoke (Kovačević i Rastija, 2014.). Pšenica se odlikuje velikim brojem varijeteta i kultivara zbog čega se prilagodila uzgoju u cijelom svijetu. Visina prinosa različita je za pojedine dijelove svijeta zbog niza čimbenika, među kojima se izdvajaju vremenski uvjeti, klima te naravno mineralna ishrana (Shewry, 2009.). Prema broju kromosoma i razini poliploidije može se podijeliti u tri skupine: diploidnu, tetraploidnu te heksaploidnu pšenicu. U istraživanju su uključene vrste iz sve tri skupine. Diploidna pšenica predstavlja začetak razvoja tetraploidnih te heksaploidnih pšenica kakve su rasprostranjene u današnje vrijeme. U početku, pšenica je bila divlja kultura zbog čega se morala prilagoditi okolišnim uvjetima kako bi preživjela. Divlje pšenice odlikuju se po nižem prinosu, ali većoj otpornosti i tolerantnosti prema štetnicima, bolestima te abiotском stresu.

Povećanjem broja stanovnika povećava se i potreba za proizvodnjom visokorodnih pšenica čime će se moći zadovoljiti svjetska potreba za hranom. Modernim oplemenjivanjem na visoki prinos djelomično su se izgubila svojstva nutritivne vrijednosti zrna i brašna, otpornosti na bolesti, štetnike te na abiotски stres. Sve veći problem kod uzgoja postaju vremenske prilike, odnosno velike oscilacije u temperaturi zraka i količini oborina te sve duljih razdoblja suše. Dio uzgajivača rješenje od suše pronašao je u navodnjavanju. Prema Tomić (2012.) u svijetu se navodnjava 18%, dok u Hrvatskoj svega 1% obradivih površina. Prema podacima, površina pod navodnjavanjem je jako malo te se zbog toga radi na oplemenjivanju te stvaranju novih kultivara tolerantnijih i prilagodljivijih na stresne uvjete. Tolerantnost genotipova na sušu je kompleksna odlika, prema Kereša i sur. (2008.), može se postići ako genotip posjeduje jedan od sljedećih mehanizama: mehanizam za smanjenje dehidracije, mehanizam za izbjegavanje suše ili mehanizam za tolerantnost na dehidraciju. Prema dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da postoje određeni geni koji su odgovorni za otpornost i prilagodljivost biljke na sušu i stres. Skupina *DREB* (*Dehydration Responsive Element Binding*) i *HSF* (heat shock factors) gena u svih biljnih vrsta utječu na razne procese u biljkama, a posebno su važni u aktivaciji gena koji utječu na reakciju biljke na abiotски stres odnosno na visoke temperature i sušu (Agarwal et al., 2006.;). U skupini *DREB* gena u heksaploidne pšenice jednu od najvažnijih uloga ima *Dreb-1* gen (Akhtar, 2012.), te su

uspješno kreirani funkcionalni markeri *Dreb* lokusa na B genomu odnosno na 3A, 3B i 3D kromosomu (Wei, 2008.). Zahvaljujući nedavno objavljenom sekvenciranom genomu pšenice od strane *Wheat Genome Sequencing Consortium* (IWGSC RefSeq v1.0, (Appels i sur., 2018.) identificirano je ukupno 576 gena iz skupine DREB gena na sva tri genoma pšenice (Hassan i sur., 2021). Oplemenjivački ciljevi usmjereni su u dva pravca: stvaranje visokorodnih kultivara te kultivara tolerantnih na abiotički stres i napade bolesti i štetnika. Cilj ovog završnog rada bio je utvrditi prisutnost *Dreb-B1* lokusa u različitim genotipovima vrsta *Triticum spelta* L. i *Triticum aestivum* L.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

Istraživanje obuhvaća 13 genotipova iz vrsta *Triticum* (tablica 1.) koje uključuju osim genotipova vrsta *T. aestivum* ssp. *spelta* i *T. aestivum* ssp. *vulgare* i genotipove vrsta *T. monococcum*, *T. diccoides*, *T. compactum*, i *T. sphaerococcum* te priznate kultivare ozime krušne pšenice.

Tablica 1. Popis genotipova pšenice uključenih u pokus

Redni broj	Genotip
1.	<i>Triticum monococcum</i> L.
2.	<i>Triticum monococcum</i> L. (SLO)
3.	<i>Triticum diccoides</i> L.
4.	<i>Triticum diccoides</i> L. (SLO)
5.	<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>spelta</i> L.
6.	Nirvana
7.	<i>Triticum compactum</i> L.
8.	<i>Triticum sphaerococcum</i> L.
9.	BC Tena
10.	Moskva 40
11.	Indira
12.	Indigo
13.	Sirban prolifik

Pšenica je vrlo složena kultura s velikim brojem varijeteta. Prema broju kromosoma i razini poliploidije možemo ih podijeliti na diploidne ($2n=14$) s dva seta kromosoma, tetraploidne ($2n=4x=28$) s četiri seta kromosoma i heksaploidne ($2n=6x=42$) sa šest setova kromosoma (Pavlica, 2022.).

Diploidna pšenica ili jednozrni pir je jedan od divljih srodnika današnje moderne krušne pšenice *T. aestivum* te *T. durum* te jedna od prvih udomaćenih vrsta prije 10 000 godina (Jošt, 1984.). *T. monococcum* (Slika 1.) sadrži jedan genom odnosno A genom koji se sastoji od 7 pari homolognih kromosoma i predstavljao je značajan izvor hrane stotinama godina dok ga nisu zamijenile poliploidne pšenice (Békés i sur., 2017).

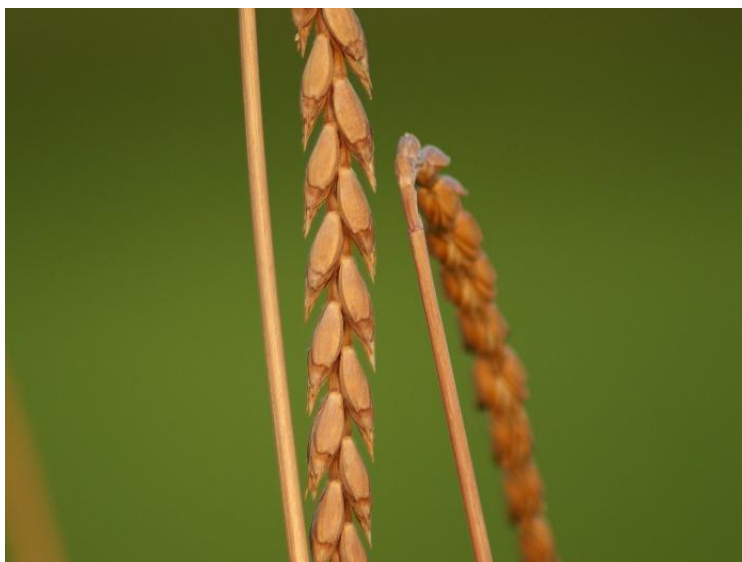
U istraživanje su od diploidnih pšenica bili uključeni *Triticum monococcum* L. i *Triticum monococcum* L. (SLO), iz Slovenije, korišteni kao kontrolne skupine. Tetraploidne vrste

pšenica su većim dijelom izvedene iz divlje dvovrzne pšenice, *Triticum dicoccoides* L., koja je rezultat spontane hibridizacije dviju diploidnih trava T. urartu i divlje kozje trave *Aegilops searsii*, donora D genoma ključnog za razvoj heksaploidne pšenice.

Među tetraploidne pšenice pripada druga po uzgoju u svijetu, pšenica *Triticum turgidum* subsp. *Durum* jedna od prvih udomaćenih vrsta. Durum pšenica poznatija kao tvrda pšenica uzgaja se u područjima s izrazito malom količinom oborina jer u takvim uvjetima daje veće prinose od drugih vrsta pšenica. Predstavnici tetraploidne pšenice (AABB) korišteni u istraživanju su *Triticum diccoides* i *Triticum diccoides* (SLO)- iz Slovenije. Heksaploidna pšenica je trenutno u uzgoju zbog stabilnog prinosa i kvalitete u najvećem opsegu proizvodnje. Kod heksaploidne pšenice (AABBDD) broj kromosoma je trostruko veći nego kod diploidne pšenice, te je više prostora za oplemenjivačke programe. U istraživanju je uključeno devet predstavnika heksaploidnih pšenica: *Triticum spelta* L. (Slika 2.), Nirvana, *Triticum compactum* L., *Triticum sphaerococum* L., BC Tena, Moskva 40, Indira, Indigo te Sirban prolifik. Nirvana je novosadska sorta pšenice koja se odlikuje po dobroj otpornosti na zimu te visokom sadržaju proteina. BC Tena je visokokvalitetna sorta pšenice nastala na BC Institutu Zagreb. Hrvatska sorta Indira uvrštena je na sortnu listu 2020. godine te se odlikuje po visokim prinosima, nastala na Poljoprivrednom institutu Osijek. Sirban prolifik sorta pšenice koja je u Hrvatskoj početkom 20. stoljeća bila vodeća standardna sorta pšenice (Martinić-Jerčić, 2000.)



Slika 1. *Triticum monococcum* L. (<https://www.stockfood.be/>)



Slika 2. *Triticum spelta* L. (<https://www.agronomija.info/>)

2.2. Uzgoj klijanaca

Sjeme svake sorte posijano je zasebno u plastične posude za naklijavanje sa zemljom za sadnju (slika 3.). Naklijano sjeme stavljeno je u klima komoru u kojoj su postavljeni idealni uvjeti za klijanje i nicanje. Pod idealne uvjete za klijanje pšenice smatra se temperatura 20 °C u trajanju 14 sati što predstavlja dnevnu temperaturu te 15 °C u trajanju 10 sati što predstavlja noćnu temperaturu.



Slika 3. Sjetva klijanaca (foto original; F. Tomić)

Klijanci su zalijevani svakih 24-36 sati kako ne bi došlo do deficita vlage (Slika 4.). Tijekom 10 dana u klima komori biljke su se razvile do faze tri lista. Listovi biljaka pohranjeni su u posebne vrećice označene brojevima te čuvani na -80°C do početka procesa izolacije DNA.



Slika 4. Zalijevanje klijanaca

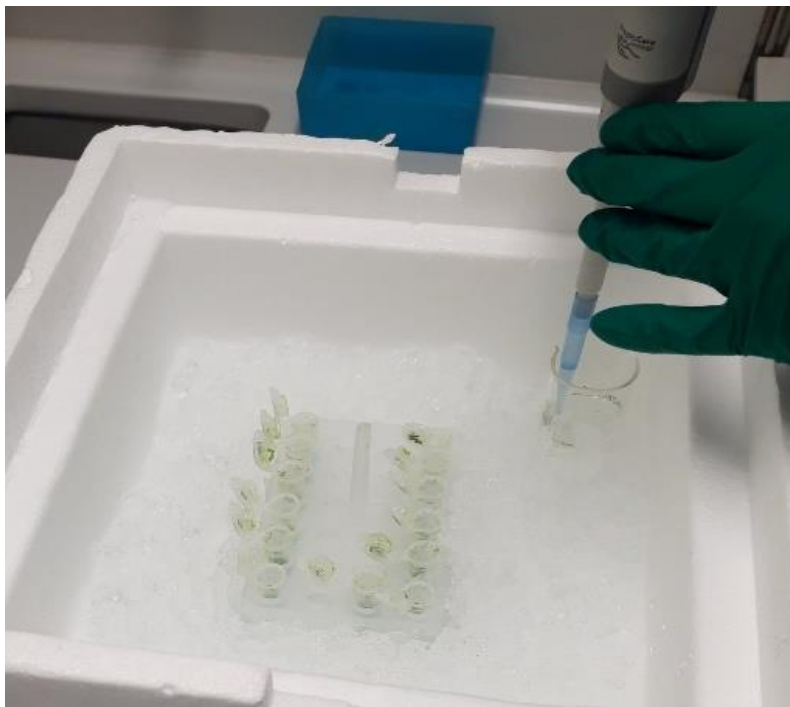
(foto original: F. Tomić)

2.3. Izolacija genomske DNA

Izolacija DNA provedena je prema CTAB (cetil-trimetil-amonij-bromid) metodi (Doyle i Doyle, 1987.). CTAB metoda je jedna od najčešće korištenih metoda za izolaciju DNA. Metoda se odlikuje po visokoj čistoći izolirane DNA, brzini izolacije te nižoj cijeni u odnosu na ostale metode. Od samog otkrića pa do danas koristi se u velikom broju istraživanja. Izolacija DNA provodi se u nekoliko koraka.

U prvom koraku odvija se homogenizacija biljnog materijala, nakon čega slijedi razaranje biljno tkiva odnosno liza stanica u izolacijskom CTAB puferu puferom gdje dolazi do odvajanja ugljikohidrata, proteina i dr. U sljedećem koraku izoamilnim alkoholom dolazi do izdvajanje alkoholne i vodene faze nakon čega slijedi centrifugiranje. Centrifugiranjem se postiže odvajanje krute od vodenaste faze u kojoj se nalazi DNA. Dodavanjem izopropanola izdvojena DNA se taloži, te u završnoj fazi peleta DNA se pere alkoholom.

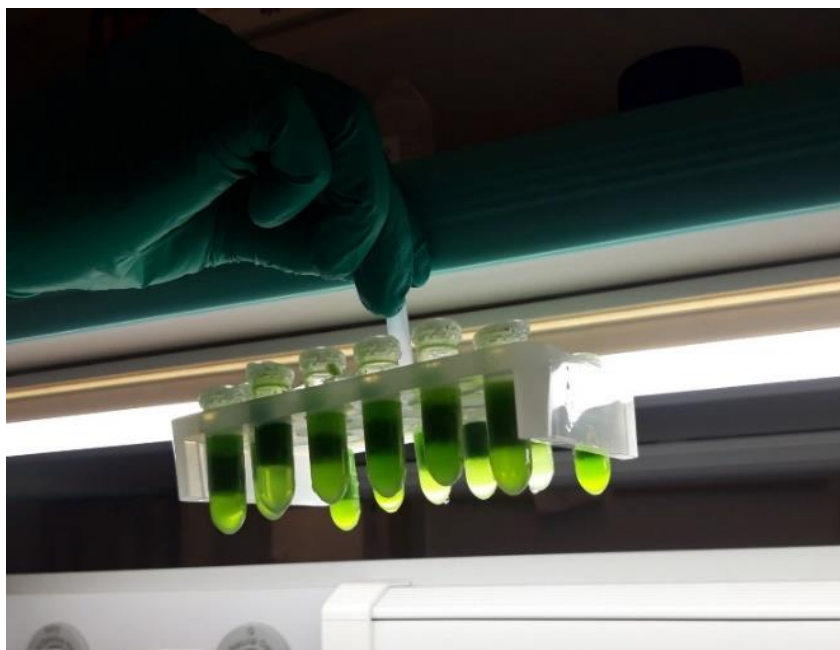
Odvagano je 20 mg listova koji su stavljani u ohlađene tarionike. Prethodno izvagani listovi prelivevi su tekućim dušikom i tučkom samljeveni u fini prah. U svaki uzorak pipetom je dodano 1000 μL zagrijanog 2% CTAB izolacijskog pufera (1M Tris-HCl pH 8.0; 0,5 Na₂EDTA pH 8.0; 5 M NaCl; 10% SDS). Sadržaj je jako dobro izmiješan te potom izliven u prethodno obilježene tubice od 2 mL. Uzorci su kratko promiješani pomoću vrtložne miješalice (vorteksa) nakon čega su stavljani u vodenu kupelj (65 °C) na inkubaciju u trajanju od 45 minuta uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije tubice s uzorcima su premještene u posudu s ledom gdje je u svaku dodano 670 μL SEVAG-a (kloroform/izoamilni alkohol 24:1) (slika 5.). Dodavanjem SEVAG-a se smanjuje pjenjenje uzorka, nastoje se ukloniti proteini iz otopine biljnoga tkiva i kloroform pospješuje vidljivo razdvajanje dvije faze otopine, zeleno obojanog dijela odnosno organskog dijela u kojem se nalazi fenol i ostaci biljnoga tkiva i vodenog dijela u kojem se polako izdvaja molekula DNA (slika 6).



Slika 5. Dodavanje kloroform izoamilnog alkohola

(foto original: F. Tomić)

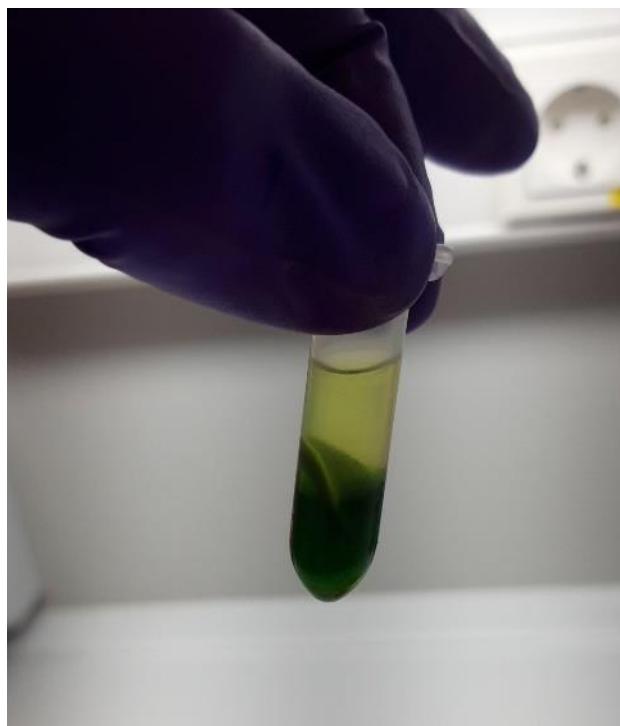
Uzorci su lagano invertirani nakon čega su postavljeni na uređaj za mućkanje u trajanju 30 minuta. Sljedeći korak obuhvaćao je centrifugiranje brzinom 14000 okretaja u minuti, u trajanju 8 minuta.



Slika 6. Uzorci s izoamilnim alkoholom i vidljivo odvajanje dvije faze

(foto original; F.Tomić)

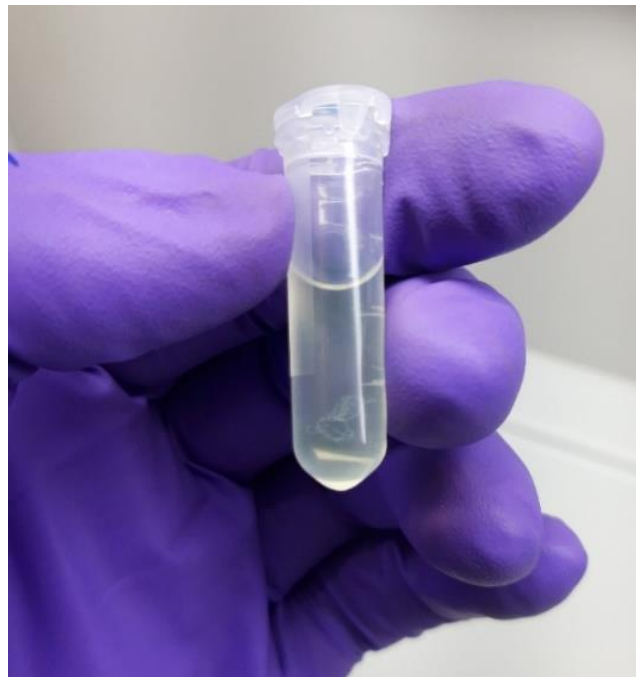
Ovim postupkom odvojena je tekuća faza od krute faze (slika 7.) pri čemu je bilo moguće izdvojiti pipetom oko 750 μL vodene fazu pri čemu se vodilo računa da se vrhom pipete ne dodiruje nastali disk i fenolni dio otopine. Pipetom je vodena faza izdvojena u novi set obilježenih tubica od 2 ml.



Slika 7. Izdvojena tekuća faza od krute faze

(foto original; F.Tomić)

U nove tubice je zatim dodano 16 μL enzima RNAze (enzim koji razgrađuje molekulu RNA) te je sve zajedeno stavljeno na inkubaciju u vodenu kupelj na 37 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon toga u tubice je dodano 650 μL 0,7 V hladnog izopropanola. Uloga hladnog izopropanola je u tome što on pospješuje učinkovitost izdvajanja molekule DNA iz otopine, a DNA je manje topiva u otopinama koje sadrže izopropanol (Green i Sambrook, 2017.). Uzorci si zatim lagano okretani rukom sve dok DNA nije postala vidljiva (slika 8.) u obliku tankih bijelih niti. Uz povremeno miješanje, DNA je stajala na sobnoj temperaturi u trajanju od minimalno sat vremena nakon čega su tubice centrifugirane 1 minutu na 14 000 okr/min.



Slika 8. Vidljiva DNA

(foto original: F. Tomić)

Pri centrifugiranju na dnu tubice formirana je bijela peleta molekule DNA. Tekućina iznad pelete pažljivo je izlivena kako bi samo peleta ostala u tubicama. Nakon toga u tubice je dodano 500 μL 0,2 mM natrij acetata u 76% etanolu čime je prana peleta približno 30 minuta laganim treskanjem tubice. Tekuća faza iznad pelete je izlivena nakon 2 minute centrifugiranja na 14 000 okr/min.

Postupak pranja peleta ponovljen je s 500 μL amonij acetata u 76% etanolu u trajanju 10 minuta. Tubice su centrifugirane 1 minutu na 14 000 okr/min (slika 9.) te je tekuća faza opet izlivena. Otvorene tubice su ostavljene u digestoru 30 do 45 minuta kako bi se postupak sušenja ubrzao. U osušene tubice dodano je 100 μL 1x TE pufera (TRIS EDTA TRIS – hidroksimetil-aminometan EDTA – EDTA dinatrijeva sol) kako bi se pelete otopile te su uzorci pohranjeni u hladnjak na temperaturu -20 °C.



Slika 9. Centrifugiranje uzoraka u zadnjem koraku izolacije
(foto original; F.Tomić)

U sljedećem koraku provjerena je čistoća izolirane DNA provjerom apsorbancija otopine DNA na dvije valne duljine biofotometrom Eppendorf D30 na 260 nm i 280 nm. Biofotometar je mikro spektrofotometrijski uređaj koji kvantificira DNA, RNA ili proteina na principu fotoelektričnog mjerenja zračenja koje DNA, RNA ili protein uzorak apsorbira na određenoj valnoj duljini u UV/VIS području. Sve nukleinske kiseline jako apsorbiraju u UV/VIS području zbog heterocikličkih prstenastih struktura povezanih sa jednom od četiri moguće baze. Tipična maksimalna apsorpcija za molekulu DNA se odvija pri valnoj duljini od oko 260 nm (A_{260}) te ovisi o pH. No s obzirom i RNA isto ima apsorpciju pri 260 nm, a aromatske aminokiseline koje su prisutne u nekom proteinu apsorbiraju pri valnoj duljini od A 280 potrebno je prilagoditi izračun čistoće izolirane DNA tako što se omjer apsorbancije na 260 nm podijeli s očitanjem apsorbancije na 280 nm. Čistoća DNA se stoga utvrđuje na temelju omjera (A_{260})/(A_{280}), čije vrijednosti trebaju biti u rasponu od 1,7 do 2,0 što znači da je DNA bez primjesa i onečišćenja. Na početku mjerenja apsorbancije uređaj je kalibriran pomoću demineralizirane H_2O .

Koncentracija DNA u $ng/\mu L$ izračunata je na temelju izmjerenih vrijednosti aposorbancija, koristeći formulu:

$$DNA = A_{260} \times A_{280} \times 50^2$$

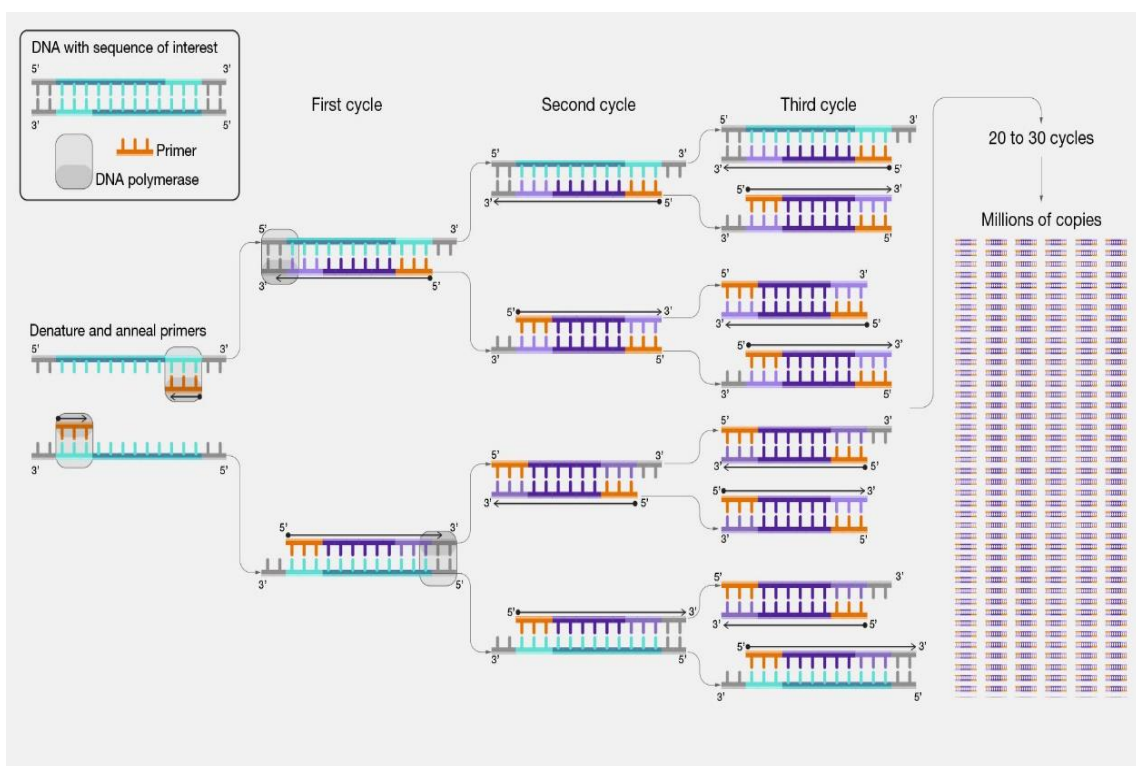
Nakon izračunate koncentracije DNA za izvođenje PCR reakcije bilo je potrebno razrijediti izoliranu DNA s TE (Tris EDTA) puferom na sljedeći način:

$$\text{DNA } (\mu\text{L}) = (20 / [\text{DNA}]) \times 50$$

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

2.4. Priprema PCR reakcije za identifikaciju *Dreb-B1* gena

Na izoliranim uzorcima provedena je PCR reakcija. PCR (Polymerase Chain Reaction) je reakcija kojom se u vrlo kratkom vremenskom periodu može amplificirati određeni dio DNA u veliki broj identičnih kopija. Reakcija se sastoji od nekoliko specifičnih faza (Slika 10.).



Slika 10. Faze PCR reakcije (izvor; <https://www.genome.gov/>)

U prvoj fazi se odvija razdvajanje DNA lanca ili denaturacija koja se odvija na visokoj temperaturi od najčešće 94 °C. Slijedi nalijeganje (amplifikacija) odabranih početnica koja se odvija na specifičnoj temperaturi nalijeganja koja ovisi o sastavu nukleotidnih baza svake početnice. Početnice su kratke oligonukleotidne sekvence „primeri“ ili početnice koji su komplementarni krajevima istraživanog ulomka DNA te još nazivaju i DNA markeri. Treći korak je produljivanje lanca DNA na temperaturi od najčešće 72 °C i ciklus se ponavlja ovisno o protokolu najčešće 35 puta. Tijekom n (20-50) ciklusa reakcije PCR nastaje 2ⁿ molekula DNA.

DNA markeri otkrivaju genetsku varijabilnost izravno DNA na razini, a do sada je poznato više vrsta molekularnih markera kao što su: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Slučajno amplificirana polimorfna DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence – Izrezane polimorfne amplificirane sekvence) itd. (Šatović 1999.) pa su tako jedne od najčešće korištenih jednostavne ponavljajuće sekvence (SSR - Simple Sequence Repeats) - SSR markeri ili mikrosateliti imaju vrlo visok stupanj polimorfizma i mogućnost razlikovanja vrlo srodnih genotipova biljaka, pa tako i pšenice (Morgante i Olivieri, 1993.). U radu su korištene mikrosatelitne početnice ili SSR (Simple Sequence Repeat – Jednostavne ponavljajuće sekvence)

U istraživanju su korištene mikrosatelitne početnice (5'→3'):

P18R: CCCAACCCAAGTGATAATAATCT

P18L: TTGTGCTCCTCATGGGTACTT

koje se koriste kao funkcionalni marker na prisutnost *Dreb-B1* gena na 3B kromosomu pšenice s preporučenom temperaturom nalijeganja početnica od $T_a=50$ °C i očekivanim fragmentom od oko 717 pb (Wei i sur., 2009.).

DREB su proteini koji u stresnim uvjetima reagiraju ekspresijom mnogih gena čime se postiže poboljšana tolerancija na sušu, visoke količine soli te niske temperature (Lata i sur., 2011.). Prema Niu i sur. (2020.) skupina *Dreb* gena podijeljena je u šest podskupina (A1-A6) te članovi različitih podskupina sudjeluju u odgovoru na različite abiotičke stresove. Tako na primjer, u podskupinu A1 pripadaju *Dreb-A1* geni, koji u riži i kukuruzu reagiraju na hladni stres. U podskupini A2 nalaze se *Dreb-2A* i *Dreb-2B* koji u riži i biljci čaja reagiraju na stres izazvan sušom i visokom količinom soli.

Neposredno prije amplifikacije bilo je potrebno pristupiti samoj optimizaciji PCR reakcije promjenama temperaturnih uvjeta te odabirom koncentracije i količine amplifikacijskih reagensa PCR smjese DNA (tablica 2.). Svaka PCR smjesa se sastoji od genomske DNA, ultra čiste vode, pufera, $MgCl_2$, smjese slobodnih nukleotida (dNTP), početnica te specifičnog termostabilnog enzima odnosno DNA polimeraze. U PCR reakcijama se najčešće koristi Taq polimeraza koja je termostabilna nazvana po termofilnoj bakteriji *Thermus aquaticus*.

PCR reakcija provedena je na uređaju Applied Biosystems Veriti® Thermal Cycler koristeći sljedeći program:

1. korak 3 minute na 94 °C
2. korak 35 ciklusa od 1 minuta na 94 °C, 1 minuta na 56 °C ,1 minuta i 30 sekundi na 72 °C
3. korak 10 minuta na 72 °C

Tablica 2. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za amplifikaciju početnica P18F i P18R

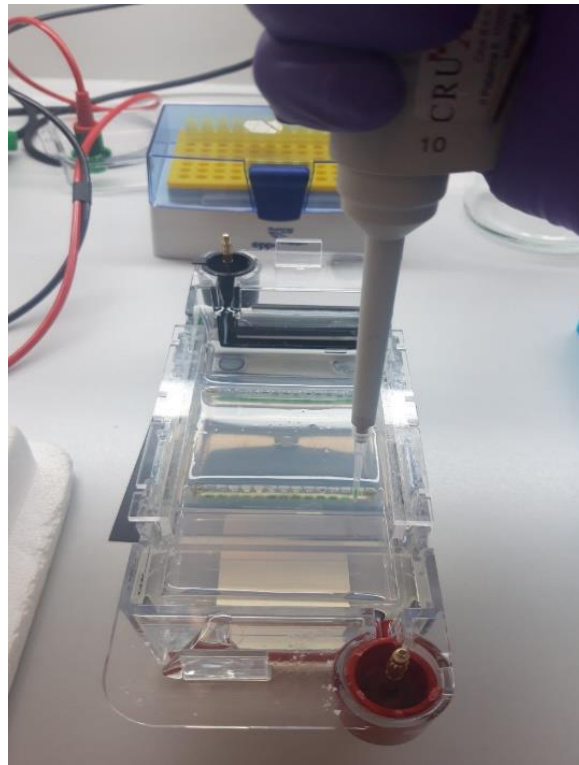
Reakcijska smjesa	Ishodišna koncentracija	Radna koncentracija	Volumen po reakciji
PCR pufer	5x	1x	3 µL
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,9 µL
dNTP mix	10 mM	0,1 mM	0,15 µL
P18 L- početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µL
P18 R- početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µL
Taq polimeraza	5 U/µl	0,025 U/µl	0,075 µL
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2,7 µL
d.d. H ₂ O			8,635 µL

Nakon provedene PCR reakcije produkti amplifikacije su provjeravani koristeći metodu elektroforeze na 2% agaroznom gelu.

2.5. Detekcija mikrosatelitnih početnica elektroforezom

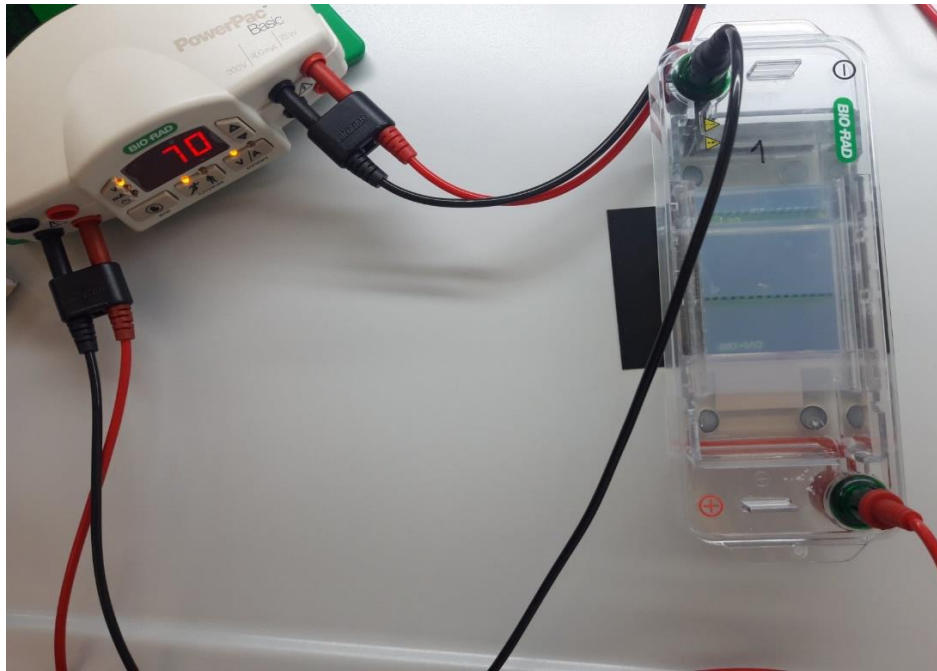
Elektroforeza je tehnika pomoću koje je moguće razdvajanje fragmenata nukleinskih kiselina ili proteina u istosmjernom električnom polju u viskoznom puferu. Kretanje čestica se odvija u ovisnosti o samom naboju čestice te naboju elektrode (negativno nabijene čestice prema pozitivno nabijenoj elektrodi, katodi, a pozitivno nabijene čestice prema negativno nabijenoj elektrodi, anodi) dok je fragmente moguće razlikovati na temelju njihove veličine pri čemu manji fragmenti putuju brže od većih fragmenata (Ambriović Ristov i sur. (2007.)). Produkti PCR reakcije nanoseni su na 2% agarozni gel u 1 x TBE puferu. Agarozni gel bio je dimenzije 7 x 10 cm, debljine 1 cm, a za pripremu gela bilo je potrebno: 60 ml 1 x TBE pufera i 1,2 g agaroze. Gel je pripremljen prema sljedećem protokolu: u Erlenmeyerovu tikvicu od 200 mL dodano je 1,2 g agaroze te zatim 60 mL TBE pufera. Tikvica je zagrijavana do vrenja u mikrovalnoj pećnici u trajanju dvije do tri minute uz povremeno lagano miješanje. Nakon zagrijavanja tikvica je hlađena u vodenoj kupelji na oko 60 °C.

Otopini je zatim dodano dvije do tri kapi fluorescentne Olerup SSP® GelRed boje kako bi fragmenti DNA bili vidljivi na gelu pod UV osvjetljenjem.



Slika 11. Nanošenje produkata PCR reakcije u jažice agaroznog gela
(foto original: F. Tomić)

Gel je potom izliven u kadicu u kojoj su smještena dva češlja od 15 jažica te ostavljen na sobnoj temperaturi da se hladi dok se gel ne polimerizira. U jažice gela ispipetirano (slika 11.) je 5 μ L svakog uzorka, produkta amplifikacije. Elektroforeza je obavljena pomoću uređaja Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT (slika 12.) sa sljedećim uvjetima: 70V, 50 mA i 50 W u trajanju od 3 sata. Za utvrđivanje veličine PCR produkata, kao standard su u Promega® 100bp DNA Ladder s rasponom veličina fragmenata od 100 pb (parova baza) do 1000 pb, zajedno s pripadajućom bojom, 6x Blue/Orange Loading Dye.



Slika 12. Uređaj za elektroforezu (foto original: F. Tomić)

Po završetku elektroforeze agarozni gel s PCR produktima slikan je pomoću uređaja za snimanje Syngene® G:BOX F3 koji ima kameru rezolucije 3,8 megapiksela. Očitavanje rezultata PCR reakcija obavljeno je Syngene® programom GeneTools, kompatibilnim s GeneSys softverom ver. 1.4.1.0, i GeneSys softver pomoću kojega su identificirana točna veličina PCR produkata.

3. REZULTATI I RASPRAVA

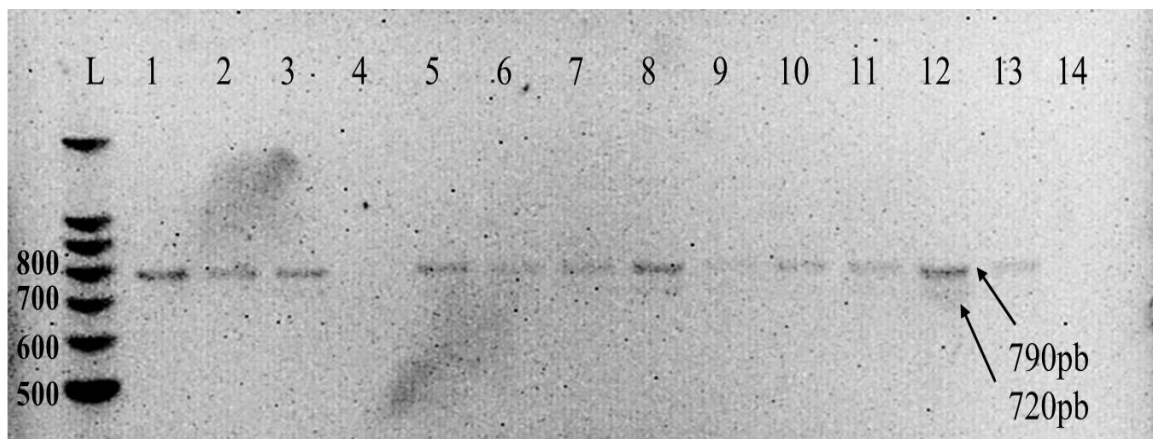
Kod odabira metode izolacije DNA najvažnije je, pored cijene koštanja te vremenskog trajanja izolacije, čistoća i kvaliteta izolirane DNA. Čistoća DNA provjerava se na osnovi omjera apsorbanci dvije valne duljine 260 (A_{260}) i 280 nm (A_{280}). Omjer apsorbanci trebao bi biti između 1,8 i 2,0, ukoliko se utvrdi omjer ispod 1,8 to znači da je DNA zagađena nusproduktima poput ugljikohidrata i proteina, a ukoliko je iznad 2,0 znači da je DNA onečišćena etanolom.

Tijekom istraživanja uspješno je izolirana DNA iz svih 13 genotipova. Provjerom čistoće pomoću spektrofotometra na dvije valne duljine utvrđeno je kako je čistoća i kvaliteta izolirane DNA bila u rasponu od 1,80 do 1,88 (tablica 3) što znači da nije bilo primjesa i onečišćenja te nije bilo potrebe za ponavljanjem postupka izolacije. Količina DNA u ng/ μ L se kretala od 456,67 (kultivar Indigo) do 987,87 (kultivar BC Tena)

Tablica 3. Čistoća i koncentracija izolirane genomske DNA

Br.	genotip	omjer apsorbanci 260/280nm	količina DNA ng/ μ L
1.	<i>Triticum monococcum</i> L.	1,88	520,02
2.	<i>Triticum monococcum</i> L. (SLO)	1,80	619,98
3.	<i>Triticum diccoides</i> L.	1,83	574,34
4.	<i>Triticum diccoides</i> L. (SLO)	1,81	857,56
5.	<i>Triticum spelta</i> L.	1,83	612,04
6.	Nirvana	1,80	726,12
7.	<i>Triticum compactum</i> L.	1,83	783,6
8.	<i>Triticum sphaerococcum</i> L.	1,84	719,61
9.	BC Tena	1,85	987,87
10.	Moskva 40	1,84	545,84
11.	Indira	1,84	587
12.	Indigo	1,84	456,67
13.	Sirban prolifik	1,82	588,92

Triticum aestivum ssp. *spelta* i *Triticum aestivum* ssp. *vulgare* pripadaju skupini heksaploidnih pšenica što znači da sadrže tri genoma A, B i D sastavljena od 7 pari kromosoma ($2n=6x=42$). *T. aestivum* ssp. *spelta* ili pravi pir vrsta je pšenice koja sadrži veći broj proteina u odnosu na *T. aestivum* ssp. *vulgare*, običnu pšenicu. Također pravi pir je otporniji na napad bolesti, štetnika te abiotskog stresa, ali je prinos znatno manji u odnosu na običnu pšenicu. Kod heksaploidne pšenice *Dreb* geni mogu biti prisutni na sva tri genoma A, B i D. Istraživanje se baziralo na identifikaciji *Dreb* gena na B lokusu.



Slika 13. Identifikacija *Dreb*-B1 gena u 13 genotipova pšenice (foto original: F. Tomić)

Na slici su brojevima od 1 do 15 označeni uzorci, dok su sa slovom L označene DNA ljestve. Broj jedan predstavlja DNA ljestve, od broja 2 do broja 14 su ispitivani genotipovi, dok je broj 15 negativna kontrola pri čemu je u PCR smjesi korištena samo voda bez DNA.

Koristeći GeneSys softver očitani su rezultati za *Dreb*-B1 gen te su dobiveni očekivani PCR fragmenti. Niži fragment od 720 pb koji je specifičan za B genom, te fragment od 790 pb. Prema Wei i sur. (2009.) i Huseynova i sur. (2013.) dvostruka amplifikacija oba fragmenta detektira genotipove tolerantne na sušu. Detekcija samo višeg fragmenta od 790pb se može okarakterizirati kao nespecifičan fragment koji se povezuje sa nedostatkom B genoma ili kromosoma 3B (Wei i sur., 2009.).

Dvostruka amplifikacija zabilježena je za uzorke 3 – *T. diccoides*, 5 – *T. spelta*, 8 – *T. sphaerococcum* i 12 – Indigo koji su jedini oba fragmenta od 720pb i 790pb, dok samo viši fragment imaju diploidne vrste *T. monococcum* (uzorci 2 i 3), te uzorci 6 – Nirvana, 7 – *T. compactum*, 9 – Bc Tena, 10 – Moskva 40 te 13 – Sirban prolifik. Neuspjela amplifikacija je zabilježena za uzorak 4 - *T. diccoides* (SLO). Zbog vrlo velike varijabilnosti te specifične varijabilnosti u B genomu za DREB1 proteine koje uključuju mutacije u tri aminokiseline (46, 140 i 200) te prisutne delecije u 24 aminokiseline u regijama koje su

bogate serinom i argininom u ortolognim A i D genomima moguća je detekcija samo jednog fragmenta od 789 pb ili odsustvo PCR produkta (Wei i sur., 2009).

Guberac i sur. (2018.) su ispitali distribuciju *Dreb-1* gena na sva tri genoma A, B i D na uzorku od 96 europskih kultivara ozime pšenice. Koristeći početnice P18 specifične za prisutnost *Dreb-B1* gena su utvrdili u 15,62 % ispitivanih kultivara pšenice, dok su za 94,79 % kultivara detektirali prisutnost *Dreb-D1* odnosno za 82,29% su identificirali *Dreb-A1* gen. Identifikaciju *Dreb-B1* gena na uzorku od 12 genotipova pšenice, među kojima su bili na sušu tolerantni, polu-tolerantni i netolerantni genotipovi, proveli su Huseynova i sur. (2013.), pri čemu je amplifikacija od 717 pb utvrđena u samo jednog genotipa (Baraktali-95) za kojega je prethodnim istraživanjima utvrđeno da posjeduje visoku tolerantnost na sušu.

4. ZAKLJUČAK

Istraživanje je provedeno u svrhu utvrđivanja prisutnosti *Dreb-B1* lokusa u 13 genotipova iz vrsta *Triticum*.

Uspješno je izolirana DNA odgovarajuće kvalitete pri čemu je količina izolirane DNA iznosila je od 456,67 do 987,87 ng/ μ L, dok se omjer apsorbanci A260/A280 kretao od 1,80 do 1,88 što ukazuje na čistu DNA.

Uspješno je provedena PCR reakcija s početnicama koristeći mikrosatelitne početnice specifične za *Dreb-B1* gen koji se nalazi na 3B kromosomu pšenice.

Utvrđena je prisutnost specifičnog alela koji karakterizira prisutnost *Dreb-B1* gena kod 4 uzorka: *T. diccoides*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum* te Indigo. Suprotno tomu, nedostatak B genoma ili kromosoma 3B pokazali su uzorci: *T. monococcum* (uzorci 2 i 3), Nirvana, *T. compactum*, Bc Tena, Moskva 40 te Sirban prolifik. Od ispitivanih 13 uzoraka na jednom uzorku amplifikacija nije uspješno provedena: *T. diccoides* (SLO).

Na uzorcima, kod koji je utvrđena prisutnost *Dreb-B1* gena, bi trebalo utvrditi prisutnosti i ostalih *Dreb* gena, na A i D genomu. Također preporuka je nastavak istraživanja postavljanjem pokusa u kontroliranim uvjetima suše te postavljanje poljskog pokusa kako bi se utvrdilo hoće li uzorci s prisutnim *Dreb-B1* genom biti tolerantniji na sušu od ostalih. U istraživanje bi bilo dobro uvrstiti dodatne kultivare sa šireg područja Europe kako bi se dobila šira slika prisutnosti gena.

5. LITERATURA

1. Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK and Sopory S.K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 25: 1263-1274
2. Akhtar, M., Jaiswal, A., Taj, G., Jaiswal, J.P., Qureshi, M.I., Singh, N.K. (2012.): DREB1/CBF transcription factors: Their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *J. Genet.* 91, 385–395.
3. Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007.). *Elektroforeza DNA u agaroznom gelu u denaturirajućim uvjetima. U Metode u molekularnoj biologiji Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 204-205.*
4. Appels, R., Eversole, K., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Stein, N., Pozniak, C. J., Choulet, F., Distelfeld, A., & Poland, J.J.S. (2018): Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361, 7191
5. Békés, F., Schoenlechner, R., Tömösközi, S. (2017). Ancient Wheats and Pseudocereals for Possible use in Cereal-Grain Dietary Intolerances (Chapter 14). Editor(s): Wrigley, C., Batey, I., Miskelly, D. In *Cereal Grains (Second Ed.)*, Woodhead Publishing. 353-389.
6. Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987.): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
7. Green, M. R., Sambrook, J. (2017). Precipitation of DNA with Isopropanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, (8), pdb.prot093385. doi:10.1101/pdb.prot093385
8. Huseynova, I. M., Rustamova, S. M., Mammadov, A. C. (2013.). Identification of Dreb 1 Genes Involved in Drought Tolerance in Wheat (*Triticum L.*). In *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future*. 552-555.
9. Jošt, M. (1984.). Međunarodni simpozij genetike pšenice. *Agronomski glasnik : Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 46 (3-4): 411-422.
10. Kereša, S., Barić, M., Horvat, M., Habuš Jerčić, I. (2008.). Mehanizmi tolerantnosti biljaka na sušu i njihova genska osnova kod pšenice. *Sjemenarstvo*, 25 (1): 35-45
11. Kovačević, V., Rastija, M., (2014.): *Žitarice*. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek. 235.
12. Lata, C., Prasad, M. (2011): Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of experimental botany*, 62(14): 4731–4748.
13. Martinić-Jerčić, Z. (2000): Oplemenjivanje ozime pšenice u hrvatskoj 1904. - 1998. S posebnim osvrtom na sortu sirban prolifik i proizvodnju. *Agronomski glasnik*, 62 (5-6):

281-296.

14. Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993:) PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3(1): 01-08
15. Niu, X., Luo, T., Zhao, H., Su, Y., Ji, W., Li, H. (2020.): Identification of wheat DREB genes and functional characterization of TaDREB3 in response to abiotic stresses. *Gene*, 740.
16. Pavlica, M. : Mrežni udžbenik iz Genetike, <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/> (14.09.2022.)
17. Shewry, P. R. (2009.): Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1537-1553.
18. Šatović, Z. (1999.): Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. *Sjemenarstvo* 16(99)1-2, 73-95.
19. Tomić, F. (2012.): Razvoj poljoprivrede primjenom navodnjavanja u bjelovarsko-bilogorskoj županiji. *Radovi Zavoda za znanstvenoistraživački i umjetnički rad u Bjelovaru*, 6; 1-15.
20. Wei, B., Jing, R., Wang, C., Chen, J., Mao, X., Chang, X., Jia, J., (2009.): Dreb1 genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) Development of functional markers and gene mapping based on SNPs. *Molecular Breeding*, 23: 13–22.