

Indentifikacija Ppo-A1 i Ppo-D1 gena u hrvatskom sortimentu pšenice

Dragomirović, Matej

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:151:601032>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



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

Matej Dragomirović

Sveučilišni prijediplomski studij Poljoprivreda

Modul Bilinogojstvo

**Identifikacija Ppo-A1 i Ppo-D1 gena u hrvatskom sortimentu
pšenice**

Završni rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Matej Dragomirović

Sveučilišni prijediplomski studij Poljoprivreda

Modul Bilinogojstvo

**Identifikacija Ppo-A1 i Ppo-D1 gena u hrvatskom sortimentu
pšenice**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

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

Osijek, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni prijediplomski studij, modul Bilinogojstvo

Završni rad

Matej Dragomirović

Identifikacija Ppo-A1 i Ppo-D1 gena u hrvatskom sortimentu pšenice

Sažetak: Polifenol oksidaza (PPO) je enzim koji utječe na kvalitetu pšenice i proizvoda od pšenice. Aktivnost polifenol oksidaze kontrolirana je PPO genima, od kojih su najviše proučavani oni smješteni na kromosomima pšenice 2AL i 2DL. Primjena molekularnih markera, koji su povezani s glavnim PPO genima, ima važnu ulogu u selekciji genotipova s niskom aktivnosti PPO. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi zastupljenost Ppo-A1 i Ppo-D1 gena u hrvatskom sortimentu pšenice. Istraživanje je provedeno na 30 hrvatskih sorti pšenice. PCR analiza provedena je korištenjem tri para početnica za analizu Ppo-A1 i Ppo-D1 lokusa. Produkti amplifikacije analizirani su horizontalnom elektroforezom. Na Ppo-A1 lokusu, Ppo-A1a alel utvrđen je kod 43,33 % ispitivanih sorti pšenice, a alel Ppo-A1b kod njih 56,67 %. Na Ppo-D1 lokusu, Ppo-D1a alel utvrđen je kod 63,33 % ispitivanih sorti pšenice, a alel Ppo-D1b kod njih 36,67 %. Najveću učestalost imala je kombinacija alela Ppo-A1b i Ppo-D1a koja je zabilježena kod 40 % ispitivanih sorti pšenice.

Ključne riječi: polifenol oksidaza, Ppo geni, pšenica

20 stranica, 8 tablica, 11 grafikona i slika, 11 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u Knjižnici 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

BSc Thesis

Matej Dragomirović

Identification of Ppo-A1 and Ppo-D1 genes in Croatian wheat varieties

Summary: Polyphenol oxidase (PPO) is an enzyme that affects the quality of wheat and wheat products. Polyphenol oxidase activity is controlled by PPO genes, with the most studied being those located on wheat chromosomes 2AL and 2DL. The use of molecular markers, which are related to the main PPO genes, has an important role in the selection of genotypes with low PPO activity. The aim of this research was to determine the presence of Ppo-A1 and Ppo-D1 genes in the Croatian wheat varieties. The research was conducted on 30 Croatian wheat varieties. PCR analysis was performed using three pairs of primers for the analysis of the Ppo-A1 and Ppo-D1 loci. Amplification products were analyzed by horizontal electrophoresis. At the Ppo-A1 locus, the Ppo-A1a allele was present in 43.33% of the examined wheat varieties, and the Ppo-A1b allele in 56.67% of them. At the Ppo-D1 locus, the Ppo-D1a allele was present in 63.33% of the tested wheat varieties, and the Ppo-D1b allele in 36.67% of them. Combination of alleles Ppo-A1b and Ppo-D1a had the highest frequency and was recorded in 40% of the tested wheat varieties.

Keywords: polyphenol oxidase, Ppo genes, wheat

20 pages, 8 tables, 11 figures, 11 references

Final work is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Cilj istraživanja | 2 |
| 2. MATERIJAL I METODE | 3 |
| 2.1. Izbor sorti | 3 |
| 2.2. Uzgoj klijanaca | 4 |
| 2.3. Izolacija DNA iz tkiva lista pšenice | 5 |
| 2.4. Provjera koncentracije DNA pomoću spektrofotometra | 7 |
| 2.5. PCR analiza za detekciju Ppo-A1 i Ppo-D1 gena | 9 |
| 2.6. Horizontalna elektroforeza | 11 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 12 |
| 4. ZAKLJUČAK | 18 |
| 5. POPIS LITERATURE | 19 |

1. UVOD

Pšenica (*Triticum spp.*) (Slika 1) je kultura koja pripada porodici *Poaceae* i uzgaja se diljem svijeta te pokriva površine veće nego ijedna druga žitarica (Kayani i sur., 2010.). Globalno ona je najvažnija kultura u prehrani ljudi od samih začetaka čovječanstva. Prerodom pšenice dobiva se brašno od kojeg se proizvodi kruh, tjestenina i drugi prehrambeni proizvodi. Kvaliteta pšenice genetski je određena sastavom gluteninskih podjedinica, tvrdoćom zrna, aktivnosti polifenol oksidaze i viskoznosti škroba (Zhang i sur., 2008.).



Slika 1. Klasovi pšenice (<https://www.poslovni.hr/hrvatska/>)

Polifenol oksidaza je enzim koji uzrokuje nepoželjno tamnjenje i promjenu boje proizvoda od krušne pšenice do kojeg može doći tijekom obrade ili skladištenja. PPO katalizira hidroksilaciju o-monofenola u o-difenole i oksidaciju o-difenola u o-kinone. Aktivnost polifenol oksidaze kontrolirana je PPO genima. PPO geni pšenice pripadaju velikoj porodici gena koji s obzirom na ekspresiju mogu biti unutar ili izvan zrna pšenice. Smatra se da je aktivnost PPO kod pšenice uglavnom uvjetovana genima koji se nalaze na homolognim kromosomima grupe 2. Najviše proučavani PPO geni su oni smješteni na kromosomima 2AL i 2DL (Singh i sur., 2009.).

Aktivnost PPO znatno varira između različitih genotipova, ali i različitih okolina. Genotipovi pšenice s niskom aktivnosti PPO poželjni su za prerađivače, ali i krajnje potrošače. Zbog

toga su oplemenjivački programi usmjereni na selekciju i razvoj kultivara sa niskom aktivnosti PPO (Chang i sur., 2007.).

Aktivnost enzima polifenol oksidaze je fiziološko-biokemijsko svojstvo kod kojeg se selekcija ne može provoditi na osnovu morfoloških svojstava. Iz tog razloga primjena molekularnih markera, koji su povezani s glavnim PPO genima, ima važnu ulogu u selekciji genotipova s niskom aktivnosti PPO (Wang i sur., 2009.).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi zastupljenost Ppo-A1 i Ppo-D1 gena u hrvatskom sortimentu pšenice.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Izbor sorti

U svrhu izrade ovog završnog rada izabrano je 30 hrvatskih sorti pšenice. Popis sorti s njihovim imenima i godinom priznavanja prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Popis ispitivanih sorti pšenice

| R.br. | Sorta | Godina |
|-------|---------------|--------|
| 1 | KATA | 1997. |
| 2 | SNAŠA | 1993. |
| 3 | PANONIJA | 2002. |
| 4 | ANA | 1988. |
| 5 | NOVA ŽITARKA | 2010. |
| 6 | SANA | 1983. |
| 7 | ADRIANA | 1988. |
| 8 | BC PATRIA | 1994. |
| 9 | BC ELVIRA | 2002. |
| 10 | MARIJA | 1988. |
| 11 | MIHELCA | 1996. |
| 12 | PRIMA | 2001. |
| 13 | MATEA | 2005. |
| 14 | GABI | 1999. |
| 15 | KRUNA | 1997. |
| 16 | FIESTA | 1998. |
| 17 | MURA | 1967. |
| 18 | KALISTA | 2005. |
| 19 | BELA | 2003. |
| 20 | HELIA | 2005. |
| 21 | DONNA | 2007. |
| 22 | BIANCA | 2010. |
| 23 | NEVENA | 2009. |
| 24 | MIA | 2009. |
| 25 | PIPI | 2006. |
| 26 | FELIX | 2008. |
| 27 | ZLATNA DOLINA | 1971. |
| 28 | SEKA | 2006. |
| 29 | TENA | 1973. |
| 30 | EMA | 2010. |

2.2. Uzgoj klijanaca

Nakon izbora sorti njihovo sjeme je posijano u tresetne pelete (Jiffy 7) kako bi se dobilo tkivo lista potrebno za izolaciju DNA. Tresetni peleti brzo apsorbiraju vodu i bubre povećavajući svoj volumen što omogućava svakoj individualnoj biljci dovoljno prostora za rast i razvoj.

Biljčice su rasle u periodu od 14 dana (Slika 2), pri čemu im je bila osigurana voda i dovoljno svjetlosti. Nakon 14 dana odsječeni su mali dijelove svake biljčice (listovi) i odvojeni za sljedeći korak, odnosno izolaciju DNA iz biljnog materijala.



Slika 2. Klijanac pšenice u tresetnom peletu (Dragomirović, M.)

2.3. Izolacija DNA iz tkiva lista pšenice

Izolacija genomske DNA iz tkiva lista pšenice provedena je korištenjem CTAB metode (Doyle i Doyle, 1987.) uz određene modifikacije.

Izolacija je provedena na sljedeći način:

- Odvagano je 20 mg biljnog materijala. U tarionik je stavljen uzorak biljnog materijala i prelišen tekućim dušikom (Slika 3). Pomoću tučka usitnjen je u fini prah.
- U svaki uzorak dodano je 1000 μ l 2 % pufera CTAB koji je prethodno zagrijan na 65 °C. Smjesa praha i pufera prenešena je u tubice od 2 ml. Tubice su vorteksirane.



Slika 3. Uzorak listova pšenice (Dragomirović, M.)

- Uzorci su stavljeni u vodenu kupelj na 65 °C na 45 minuta.
- Uzorci su premješteni na led te im je dodano 670 μ l kloroforma izoamil alkohola. Tubice su okrenute par puta rukom.
- Tubice su postavljene na treskalicu 30 min.
- Tubice su centrifugirane na 15 000 rpm 8 minuta (Slika 4). Tubice su pažljivo izvađene da se ne razbije stvoreni disk.
- Iz tubice je pipetom izvučena vodena faza iznad diska i prenešena u novu tubicu.
- U tubice je dodano 16 μ l RNAze A.

- Tubice su stavljene na treskalicu 30 minuta.
- U tubice je dodano 650 μ l hladnog izopropanola. Tubice smo lagano okretali dok DNA nije postala vidljiva. Tubice su ostavljene u izopropanolu 1 sat.
- Tubice su centrifugirane na 15 000 rpm 1 minutu. Tekućina iznad formirane pelete je pažljivo izlivena iz tubice.
- Pelete su prane 30 minuta s 500 μ l 0,2 mM natrijevog acetata u 76 % etanolu.
- Uzorci su zatim centrifugirani na 15 000 rpm 2 minute. Tekuća faza je izlivena.
- Pelete su potom prane 10 minuta s 500 μ l 10 mM amonijevog acetata u 76 % etanolu.
- Uzorci su zatim centrifugirani na 15 000 rpm 1 minutu. Tekuća faza je izlivena.
- Tubice su ostavljene otvorene kako bi se peleta osušila.
- Osušene pelete otopljene su u 100 μ l TE pufera.
- Uzorci DNA pohranjeni su hladnjak.



Slika 4. Centrifuga Eppendorf 5425 (Dragomirović, M.)

2.4. Provjera koncentracije DNA pomoću spektrofotometra

Spektrofotometrija je standardna metoda za kvantifikaciju i procjenu čistoće DNA. Koristi se za mjerenje apsorbance DNA uzoraka na specifičnim valnim duljinama. Omjeri apsorbanci A260/A280 i A260/A230 daju nam informaciju o čistoći DNA uzoraka.

Prije mjerenja samih uzoraka DNA prvo je napravljena slijepa proba pomoću TE pufera.

Na stakalce kivete dodavali smo 1,5 μ l uzorka, nakon čega je kiveta postavljena u spektrofotometar kako bi se očitale apsorbance (Slika 5).

Na zaslonu spektrofotometra dobiveni su podaci o koncentraciji DNA i omjerima apsorbanci A260/A280 i A260/A230 koji su korišteni za procjenu čistoće.



Slika 5. BioPhotometer D30 (Dragomirović, M.)

Rezultati dobiveni spektrofotometrijskom analizom prikazani su u Tablici 2 za svaki pojedini uzorak.

Tablica 2. Koncentracije i omjeri apsorbanci DNA uzoraka

| R.br. | Sorta | A260/A280 | A260/A230 | Konc. (ng/μl) |
|-------|---------------|-----------|-----------|---------------|
| 1 | KATA | 1,77 | 1,98 | 639,7 |
| 2 | SNAŠA | 1,92 | 2,36 | 417,25 |
| 3 | PANONIJA | 1,72 | 2,01 | 462,53 |
| 4 | ANA | 1,95 | 2,41 | 287,33 |
| 5 | NOVA ŽITARKA | 1,85 | 2,31 | 596,68 |
| 6 | SANA | 1,86 | 2,18 | 314,83 |
| 7 | ADRIANA | 1,77 | 2,15 | 178,77 |
| 8 | BC PATRIA | 1,75 | 2,14 | 418,9 |
| 9 | BC ELVIRA | 1,73 | 1,99 | 516,99 |
| 10 | MARIJA | 1,89 | 2,21 | 925,27 |
| 11 | MIHELCA | 1,6 | 2 | 107,47 |
| 12 | PRIMA | 1,84 | 2,21 | 1298 |
| 13 | MATEA | 1,84 | 2,16 | 550,26 |
| 14 | GABI | 1,79 | 2,17 | 558,21 |
| 15 | KRUNA | 1,81 | 2,13 | 225,84 |
| 16 | FIESTA | 1,86 | 2,35 | 1127,2 |
| 17 | MURA | 1,9 | 2,25 | 1141 |
| 18 | KALISTA | 1,87 | 2,03 | 464,8 |
| 19 | BELA | 1,87 | 2,1 | 357,71 |
| 20 | HELIA | 1,83 | 2,49 | 214,56 |
| 21 | DONNA | 1,87 | 2,17 | 870,74 |
| 22 | BIANCA | 1,8 | 2,05 | 722,21 |
| 23 | NEVENA | 1,74 | 2,04 | 521,69 |
| 24 | MIA | 1,88 | 2,31 | 371,6 |
| 25 | PIPI | 1,85 | 2,25 | 758,27 |
| 26 | FELIX | 1,86 | 2,22 | 340,58 |
| 27 | ZLATNA DOLINA | 1,84 | 2,15 | 533,25 |
| 28 | SEKA | 1,8 | 1,9 | 582,62 |
| 29 | TENA | 1,84 | 2,21 | 563,45 |
| 30 | EMA | 1,81 | 2,08 | 576,48 |

2.5. PCR analiza za detekciju Ppo-A1 i Ppo-D1 gena

PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) analiza provedena je korištenjem tri različita markera, PPO18 (Sun i sur., 2005.), PPO16 i PPO29 (He i sur., 2007.). U Tablici 3 navedene su sekvence početnica i očekivani fragmenti.

Tablica 3. Sekvence početnica i očekivani fragmenti

| Gen/Lokus | Marker | Sekvence početnica | Alel | Očekivani fragment |
|-----------|--------|--------------------------|---------|--------------------|
| Ppo-A1 | PPO18 | F: AACTGCTGGCTCTTCTTCCCA | Ppo-A1a | 685 bp |
| | | R: AAGAAGTTGCCCATGTCCGC | Ppo-A1b | 876 bp |
| Ppo-D1 | PPO16 | F: TGCTGACCGACCTTGACTCC | Ppo-D1a | 713 bp |
| | | R: CTCGTCACCGTCACCCGTAT | | |
| | PPO29 | F: TGAAGCTGCCGGTCATCTAC | Ppo-D1b | 490 bp |
| | | R: AAGTTGCCCATGTCCTCGCC | | |

Prije početka same PCR analize potrebno je pripremiti PCR mix sa komponentama koje će reagirati u reakciji. U Tablici 4 navedene su komponente PCR mixa (Promega). Za provedbu PCR analize korišten je uređaj Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (Slika 6).

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese

| Komponenta | Volumen po reakciji (μl) |
|---------------------------|--------------------------|
| d.d. H ₂ O | 9,4 |
| puffer (5x) | 2,3 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0,9 |
| dNTP (10 mM) | 0,12 |
| R početnica (10 μM) | 0,11 |
| F početnica (10 μM) | 0,11 |
| Taq polimeraza (5U/μl) | 0,06 |
| DNA (50 ng/μl) | 2 |
| Ukupno: | 15 |



Slika 6. Uređaj korišten za PCR analizu (Dragomirović, M.)

U Tablici 5 navedeni su uvjeti PCR reakcije za markere PPO16 i PPO29, prema Zhang i sur. (2008.). U Tablici 6 navedeni su uvjeti PCR reakcije za marker PPO18, prema Zhang i sur. (2016.).

Tablica 5. PCR program za markere PPO16 i PPO29

| | | | |
|------------|--------------|----------------|------|
| 95 °C | 5 min | | |
| 94 °C | 30 s | | 41 x |
| 66 - 54 °C | 30 s | -0,3 °C/ciklus | |
| 72 °C | 1 min i 35 s | | |
| 72 °C | 10 min | | |

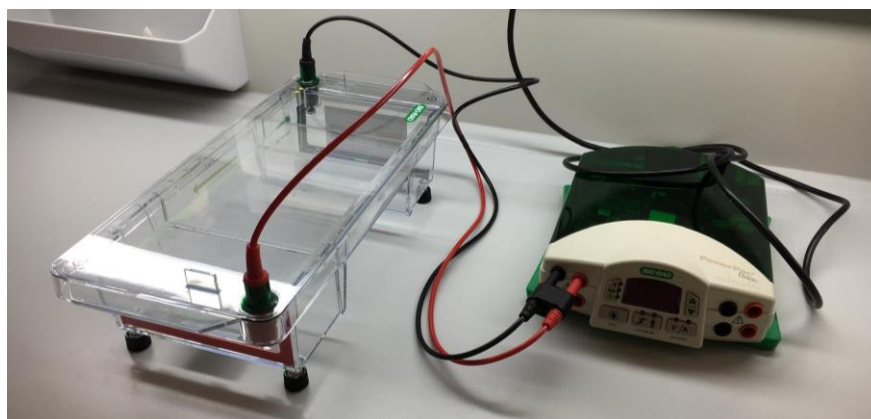
Tablica 6. PCR program za marker PPO18

| | | |
|-------|-------|------|
| 95 °C | 5 min | |
| 95 °C | 45 s | 35 x |
| 63 °C | 45 s | |
| 72 °C | 1 min | |
| 72 °C | 8 min | |

2.6. Horizontalna elektroforeza

Prije same elektroforeze pripremljen je agarozni gel (1-2 % ovisno o veličini produkata amplifikacije). Odvagana je odgovarajuća masa agaroznog praha koji je preliven sa 375 ml 1X TBE pufera. Smjesa je stavljena na kuhanje u mikrovalnu pećnicu kako bi se sav prah otopio. Gel je nakon toga prohladen i u njega je dodana fluorescentna boja Olerup SSP® GelRed™. Gel smo nakon toga izlili u kadu te smo postavili češljice za formiranje jažica. Kad se gel stisnuo izvadili smo češljice i prebacili kadu u uređaj za horizontalnu elektroforezu. U prve jažice stavljene su DNA ljestve, a u ostale uzorci dobiveni PCR-om. Nakon toga uređaj je spojen na izvor napajanja. Za horizontalnu elektroforezu korišten je uređaj Bio-Rad Sub-Cell GT (Slika 7).

Nakon što se DNA razdvojila, elektroforeza je ugašena i gel je prebačen u specijalno dizajniran sustav s kamerom za slikanje gela (Syngene G:BOX F3). Fotografije gela zabilježene su pomoću softvera na računalu.



Slika 7. Uređaj za horizontalnu elektroforezu (Dragomirović, M.)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Na temelju podataka dobivenih PCR i elektroforetskom analizom utvrđena je zastupljenost Ppo-A1 i Ppo-D1 gena (alela) u hrvatskom sortimentu pšenice. Zastupljenost Ppo-A1a i Ppo-A1b alela prikazana je u Tablici 7, a Ppo-D1a i Ppo-D1b alela u Tablici 8.

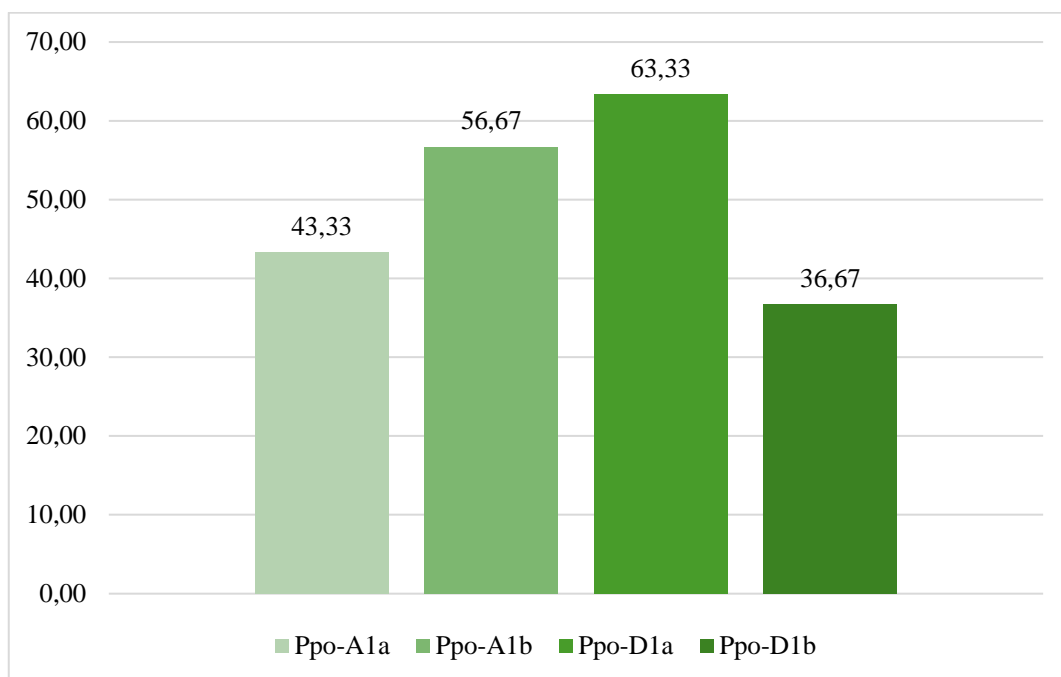
Tablica 7. Zastupljenost Ppo-A1a i Ppo-A1b alela

| R.br. | Sorta | Ppo-A1a | Ppo-A1b |
|-------|---------------|---------|---------|
| 1 | KATA | + | - |
| 2 | SNAŠA | + | - |
| 3 | PANONIJA | - | + |
| 4 | ANA | - | + |
| 5 | NOVA ŽITARKA | + | - |
| 6 | SANA | - | + |
| 7 | ADRIANA | + | - |
| 8 | BC PATRIA | - | + |
| 9 | BC ELVIRA | + | - |
| 10 | MARIJA | - | + |
| 11 | MIHELCA | - | + |
| 12 | PRIMA | - | + |
| 13 | MATEA | - | + |
| 14 | GABI | - | + |
| 15 | KRUNA | + | - |
| 16 | FIESTA | + | - |
| 17 | MURA | + | - |
| 18 | KALISTA | + | - |
| 19 | BELA | + | - |
| 20 | HELIA | - | + |
| 21 | DONNA | + | - |
| 22 | BIANCA | + | - |
| 23 | NEVENA | - | + |
| 24 | MIA | - | + |
| 25 | PIPI | - | + |
| 26 | FELIX | - | + |
| 27 | ZLATNA DOLINA | - | + |
| 28 | SEKA | - | + |
| 29 | TENA | - | + |
| 30 | EMA | + | - |

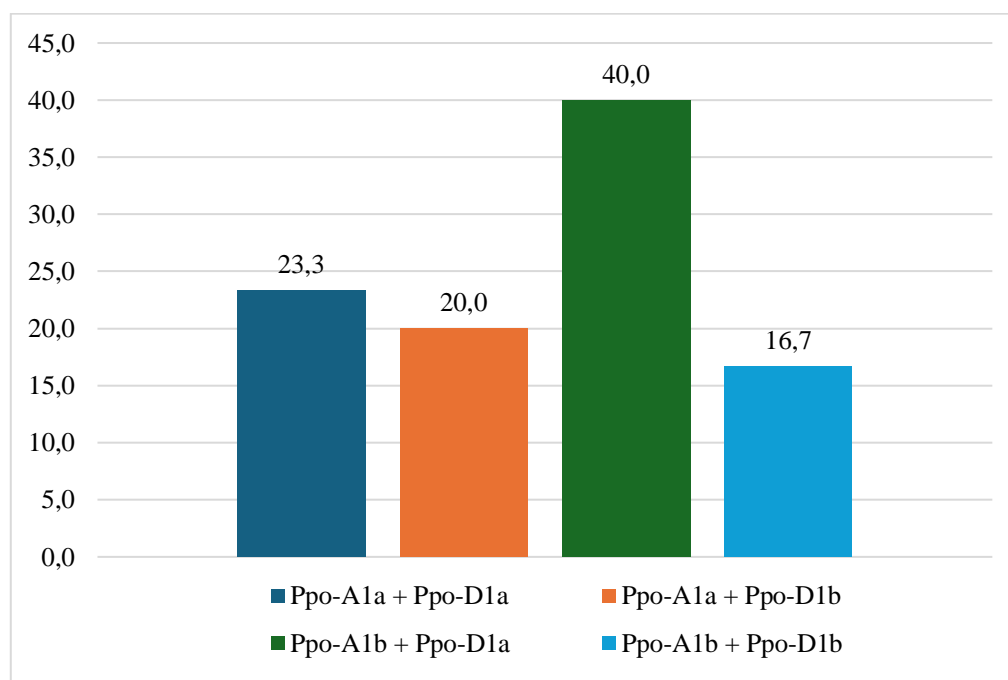
Tablica 8. Zastupljenost Ppo-D1a i Ppo-D1b alela

| R.br. | Sorta | Ppo-D1a | Ppo-D1b |
|-------|---------------|---------|---------|
| 1 | KATA | + | - |
| 2 | SNAŠA | + | - |
| 3 | PANONIJA | + | - |
| 4 | ANA | + | - |
| 5 | NOVA ŽITARKA | - | + |
| 6 | SANA | + | - |
| 7 | ADRIANA | + | - |
| 8 | BC PATRIA | + | - |
| 9 | BC ELVIRA | + | - |
| 10 | MARIJA | - | + |
| 11 | MIHELCA | - | + |
| 12 | PRIMA | + | - |
| 13 | MATEA | + | - |
| 14 | GABI | + | - |
| 15 | KRUNA | + | - |
| 16 | FIESTA | - | + |
| 17 | MURA | - | + |
| 18 | KALISTA | - | + |
| 19 | BELA | + | - |
| 20 | HELIA | + | - |
| 21 | DONNA | + | - |
| 22 | BIANCA | - | + |
| 23 | NEVENA | + | - |
| 24 | MIA | - | + |
| 25 | PIPI | - | + |
| 26 | FELIX | - | + |
| 27 | ZLATNA DOLINA | + | - |
| 28 | SEKA | + | - |
| 29 | TENA | + | - |
| 30 | EMA | - | + |

Na Ppo-A1 lokusu, Ppo-A1a alel utvrđen je kod 43,33 % ispitivanih sorti pšenice, a alel Ppo-A1b kod njih 56,67 %. Na Ppo-D1 lokusu, Ppo-D1a alel bio je prisutan kod 63,33 % ispitivanih sorti pšenice, a alel Ppo-D1b kod njih 36,67 % (Grafikon 1). Najveću učestalost imala je kombinacija alela Ppo-A1b i Ppo-D1a koja je zabilježena kod 40 % ispitivanih sorti pšenice, dok je najmanju učestalost imala kombinacija alela Ppo-A1b i Ppo-D1b (Grafikon 2).

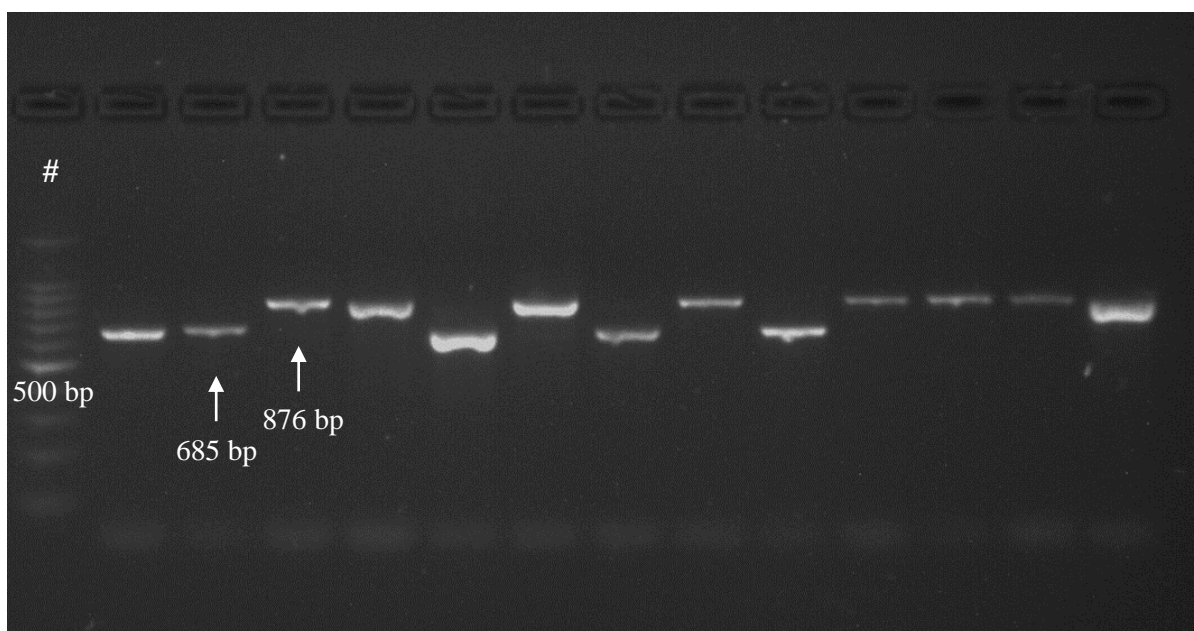


Grafikon 1. Učestalost ispitivanih alela



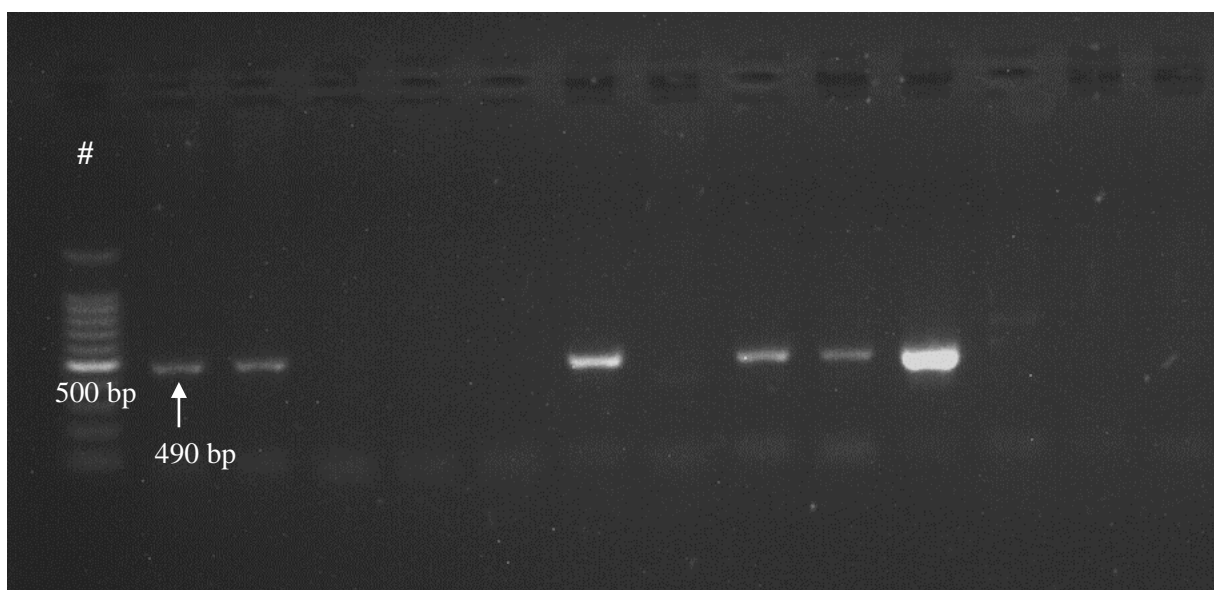
Grafikon 2. Učestalost pojedinih kombinacija alela

Na Slici 8 prikazani su produkti amplifikacije PPO18 početnica. Ppo-A1a alel prikazan je kao fragment veličine 685 bp i povezuje se s visokom aktivnosti PPO, dok je alel Ppo-A1b prikazan kao fragment veličine 876 bp i povezuje se s niskom aktivnosti PPO.



Slika 8. Gel s produktima amplifikacije PPO18 početnica (Dragomirović, M.)

Na Slici 9 prikazani su produkti amplifikacije PPO29 početnica. Na slici je prikazan alel Ppo-D1b kao fragment veličine 490 bp, a koji se povezuje s visokom aktivnosti PPO. Suprotno tome, sorte koje nemaju Ppo-D1b alel imale su Ppo-D1a alel (početnice PPO16), koji se povezuje s niskom aktivnosti PPO.



Slika 9. Gel s produktima amplifikacije PPO29 početnica (Dragomirović, M.)

Istraživanjem je utvrđeno da je najveći broj ispitivanih sorti pšenice na Ppo-A1 lokusu imao Ppo-A1b alel koji se povezuje sa niskom aktivnosti PPO. Također, na Ppo-D1 lokusu najveći broj ispitivanih sorti pšenice imao je Ppo-D1a alele koji se također povezuju s niskom aktivnosti PPO. Sukladno tome, najučestalija kombinacija alela bila je Ppo-A1b + Ppo-D1a, odnosno kombinacija dvaju alela od kojih se oba povezuju s niskom aktivnosti PPO.

Chen i sur. (2013.) ispitivali su distribuciju PPO gena na uzorku od 118 kultivara pšenice, uz pomoć markera PPO18, PPO16 i PPO29. Na Ppo-A1 lokusu prevladavao je alel Ppo-A1b (51,7 %), a na Ppo-D1 lokusu alel Ppo-D1a (55,1 %), što je u skladu s našim rezultatima. Kombinacija alela Ppo-A1b + Ppo-D1a bila je druga najučestalija (26,3 %).

Zhang i sur. (2008.) ispitivali su distribuciju PPO gena na uzorku od 70 kultivara jare pšenice. Alel Ppo-A1b utvrđen je kod 54,3 % kultivara, a alel Ppo-D1a kod njih 64,3 %. Autori navode da je Ppo-D1a alel na kromosomu 2DL manje efektivan u odnosu na alel Ppo-A1b na kromosomu 2AL.

Zhang i sur. (2016.) ispitivali su zastupljenost PPO gena kod kineskih kultivara pšenice. Ppo-A1a i Ppo-A1b aleli bili su prisutni kod 39,4 % i 60,6 % ispitivanih kultivara. Ppo-D1a i Ppo-D1b aleli bili su prisutni kod 45,8 % i 54,2 % ispitivanih kultivara.

Onto (2011.) proveo je istraživanje na 239 linija pšenice uz pomoć markera PPO18, PPO29, i STS01 za identifikaciju alela na Ppo-A1 i Ppo-D1 lokusu. Sve linije imale su fiksiran Ppo-A1 alel za nisku aktivnost PPO. Autor navodi da su markeri PPO 29 i STS01 (Ppo-D1 lokus) dali oprečne rezultate.

Chang i sur. (2007.) ispitivali su tri PPO gena čija je ekspresija specifična za nezrelo zrno pšenice te pokušali pronaći vezu između PPO gena i PPO aktivnosti sjemena. Ispitivanje je provedeno na 216 kultivara pšenice. Rezultati su pokazali da samo TaPPOA1 i TaPPO-D1 pokazuju visoke polimorfizme vezano za aktivnost PPO.

Sun i sur. (2005.) ispitivali su 233 kineske sorte pšenice i napredne linije kako bi utvrdili korelaciju između polimorfnih fragmenata PPO18 i PPO aktivnosti zrna. Rezultati su pokazali da je PPO18 kodominantan, učinkovit i pouzdan molekularni marker za aktivnost PPO i može se koristiti kod pšenice u oplemenjivačkim programima usmjerenima na poboljšanje kvalitete.

He i sur. (2007.) razvili su dva funkcionalna dominantna markera, PPO16 i PPO29, koji su mapirani na kromosomu 2DL te omogućavaju razlikovanje haplotipova Ppo-D1 gena.

Analizom je pronađen major QTL za aktivnost PPO na kromosomu 2D koji ko-segregira sa PPO16 i PPO29 te objašnjava 9,6 - 24.4 % fenotipske varijance.

Singh i sur. (2009.) navode da molekularni markeri za identifikaciju Ppo-A1 i Ppo-D1 gena mogu biti korisni za selekciju genotipova s niskom aktivnosti PPO u oplemenjivačkim programima pšenice te mogu poboljšati učinkovitost selekcije za nisku aktivnost PPO.

Na temelju provedenog istraživanja možemo zaključiti da unutar hrvatskog sortimenta pšenice postoji alelna varijabilnost na ispitivanim lokusima (Ppo-A1 i Ppo-D1) te se sorte s poželjnim alelima (niska aktivnost PPO) potencijalno mogu koristiti u proizvodnji prehrambenih proizvoda od pšenice ili kao roditeljske komponente u budućim oplemenjivačkim programima.

U nastavku istraživanja svakako bi trebalo ispitati aktivnost PPO unutar hrvatskog sortimenta pšenice kako bi se potvrdila veza između aktivnosti PPO i utvrđenih PPO gena/alela.

4. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja provedenog s ciljem utvrđivanja zastupljenosti Ppo-A1 i Ppo-D1 gena u hrvatskom sortimentu pšenice zaključeno je sljedeće:

- Unutar hrvatskog sortimenta pšenice utvrđeno je postojanje alelne varijabilnosti na ispitivanim lokusima (Ppo-A1 i Ppo-D1)
- Na Ppo-A1 lokusu najveću učestalost imao je Ppo-A1b alel (56,67 %) koji se povezuje s niskom aktivnosti PPO
- Na Ppo-D1 lokusu najveću učestalost imao je Ppo-D1a alel (63,33 %) koji se povezuje s niskom aktivnosti PPO
- Najveću učestalost imala je kombinacija alela Ppo-A1b + Ppo-D1a (40 %)
- Potrebno je dodatno ispitati aktivnost PPO unutar hrvatskog sortimenta pšenice kako bi se potvrdila veza između aktivnosti PPO i detektiranih alela

5. POPIS LITERATURE

1. Chang, C., Zhang, H. P., Xu, J., You, M. S., Li, B. Y., Liu, G. T. (2007.): Variation in two PPO genes associated with polyphenol oxidase activity in seeds of common wheat. *Euphytica*, 154: 181-193.
2. Chen, J., Chen, F., Zhan, K. H., Cui, D. Q. (2013.): Molecular identification of the polyphenol oxidase genes in bread wheat cultivars from Huanghuai wheat region. *Journal of Plant Genetic Resources*, 14(5): 900-907.
3. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987.): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15
4. He, X. Y., He, Z. H., Zhang, L. P., Sun, D. J., Morris, C. F., Fuerst, E. P., Xia, X. C. (2007.): Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 47-58.
5. Kayani, A.K., Qureshi, S., Kayani, W.K., Qureshi, R., Waheed, A., Arshad, M., Gulfraz, M., Laghari, M.K. (2010.): Assessment of wheat yield potential after cropping mungbean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek). *Pak. J. Bot.*, 42(3): 1535-1541
6. Onto, S. (2011.): Geneteics of polyphenol oxidase (PPO) activity in wheat (*Triticum aestivum* L.). Department of Agronomy and Horticulture: Dissertations, Theses, and Student Research. 35.
7. Singh, R., Goutam, U., Gupta, R. K., Pandey, G. C., Shoran, J., Tiwari, R. (2009.): Allelic variations of functional markers for polyphenol oxidase (PPO) genes in Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal of genetics*, 88(3): 325.
8. Sun, D. J., He, Z. H., Xia, X. C., Zhang, L. P., Morris, C. F., Appels, R., Wang, H. (2005.): A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat. *Molecular Breeding*, 16: 209-218.
9. Wang, X. B., Ma, C. X., Si, H. Q., Qiao, Y. Q., Chang, C., He, X. F., Xia, Y. X. (2009.): Gene markers for grain polyphenol oxidase activity in common wheat. *Molecular breeding*, 23: 163-170.

10. Zhang, X. K., Liu, L., He, Z. H., Sun, D. J., He, X. Y., Xu, Z. H., Xia, X. C. (2008.): Development of two multiplex PCR assays targeting improvement of bread-making and noodle qualities in common wheat. *Plant Breeding*, 127(2): 109-115.

11. Zhang, Y., Wang, X., Wang, X., Jiang, L., Liu, F., He, X., Zhang, X. (2016.): Development of multiplex-PCR systems for genes related to flour colour in Chinese autumn-sown wheat cultivars. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 8(2): 231-241.