

"Zbornik radova", Sveska 36, 2002.

**UTICAJ ALELNE VARIJACIJE PODJEDINICA GLUTENINA
VELIKE MOLEKULSKE MASE SA HROMOZOMIMA 1B PŠENICE
NA REOLOŠKE OSOBINE TESTA**

Dimitrijević, M., Petrović, Sofija¹

IZVOD

Uzorak od 139 genotipova pšenice, priznatih sorti i linija, je ispitivan postupkom 10% SDS-PAGE elektroforeze na alelnu varijaciju podjedinica gluteina velike molekulske mase određene genima na 1B hromozomu. Genotipovi u ispitivanju su klasifikovani prema genetičkoj konstituciji posmatrane kompozicije glutenina i upoređeni su rezultati reoloških osobina testa (farinogram i ekstenzogram). Dobijeni rezultati su pokazali da su genotipovi pšenice sa kompozicijom podjedinica gluteina velike molekulske mase 7+9 generalno iskazali najbolje rezultate reoloških osobina testa.

KLJUČNE REČI: pšenica, glutenini, farinogram, ekstenzogram, elektroforeza

Uvod

Jedan od ciljeva selekcionera je da, oplemenjivanjem, dostignu poboljšanje proteinskog sastava zrna pšenice. S obzirom da endosperm sadrži većinu važnih proteina sastav rezervnih proteina igra veliku ulogu u kvalitetu brašna i hleba. Većina ovih proteina je u formi prolamina, koji su od važnosti za karakteristike testa, kao što su rastegljivost i elastičnost (Payne, 1987). Dve komponente proteina endosperma, prolamina, su gluteini i glijadini. Gluteini su veći molekuli, izgrađeni od podjedinica povezanih disulfidnim vezama. Podjedinice mogu biti velike molekulske mase ("HMW Glu subunits", ili po novijoj nomenklaturi "high Mr subunits") i male molekulske mase ("LMW Glu subunits", odnosno "low Mr subunits"). Geni koji kodiraju glutenine velike molekulske mase se nalaze na drugom kraku prve grupe hromozoma pšenice (1A, 1B i 1D), (Payne, 1987). Detaljnije analize lokusa, afirmišu pretpostavku da se svaki *Glu-1* lokus sastoji iz

1 Dr Miodrag Dimitrijević, docent, dr Sofija Petrović, docent, Poljoprivredni fakultet i Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dva gena, koji kodiraju α i γ tipove podjedinica, koje se razlikuju u sadržaju cisteina (Lafiandra et al., 1993). Kompozicija nekih podjedinica u genotipu sorte pšenice, pokazuje korelaciju sa tehnološkim kvalitetom sorata, odabirajući kao roditelje u procesu oplemenjivanja, sorte pšenice sa kompozicijom podjedinica glutenina velike molekulske mase koje povoljno deluju na rastegljivost i jačinu testa. Pored značaja *Glu-D1* i *Glu-A1* lokusa, neki autori navode i značajniji uticaj *Glu-B1* lokusa na neke parametre kvaliteta testa, posebno kombinacije podjedinica gluteina velike molekulske mase 7+9, što iznose Randall et al. (1993), kao i kombinacije 7+8 (Oury et al., 1995; Liu i Rathjen, 1996). Ispitivanja sadržaja i kombinacije podjedinica glutenina velike molekulske mase objavljena su i za veći uzorak jugoslovenskih sorata pšenice (Vapa i Savić, 1988; Vapa i Mihaljev, 1990; Vapa i Radović, 1995), međutim, manji broj sorata je ispitivan i za uticaj ovih podjedinica, na neke parametre kvaliteta.

Cilj rada je da se ispita efekat alelne varijacije glutenina velike molekulske mase sa hromozoma 1B genoma pšenice na rezultate farinograma i ekstenzograma.

Materijal i metod rada

Uzorak genotipova pšenice se sastojao od 139 sorti i linija. Svi ispitivani genotipovi, izuzev 7 sorti, su kreacija programa oplemenjivanja Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu.

Ispitivanje kompozicije podjedinica glutenina velike molekulske mase je vršeno postupkom SDS-PAGE. Korišćen je, nešto izmenjeni, postupak Ng *et al.* (1988).

Diskontinuisana SDS-PAGE, sa koncentracijom akrilamida od 18%, debljinom gela 1.5mm, pri pH 8.3. Kao standardi su korišćene sorte poznate kompozicije podjedinica glutenina velike molekulske mase: Chinese Spring (N, 7+8, 2+12), Cappelle Desprez (N, 7, 2+12), Neepawa (2, 7+9, 5+10), Selkirk (1, 6+8, 5+10), Dundas (1, 14+15, 5+10), Fielder (N, 20, 2+12), Chinook (1/2*, 7+9, 5+10), Norman (N, 6+8, 3+12), Holdfast (1, 7+8, 5+10), Sundown (2, 17+18, 3+12), Flinor (1, 7, 2+11), Brock (N, 7, 4+12).

Ekstrakcija proteina

Ekstrakcija redukovanih proteina endosperma je vršena iz pojedinačnih zrna svakog uzorka. Prethodno pripremljeni rastvor ekstrakcionog pufera je spravljen u proporciji 5 delova glicerina : 3 gornjeg pufera (1M Tris) : 6 destilovane vode : 1 SDS : 5 pironin Y. Konačan rastvor pufera za ekstrakciju proteina velike molekulske težine je sadržao 28.3% prethodno pripremljenog rastvora, 66.6% destilovane vode i 5% 2ME (merkaptioetanol). Merkaptioetanol prekida disulfidne veze proteina.

Razdrobljeni uzorak (zrno pšenice) je stavljan u mikrokivetu, gde je dodavan i ekstrakcioni pufer u odnosu 15 μ l na 1mg brašna i ostavljen 2^h na sobnoj temperaturi. Pred upotrebu je uzorak kuvan oko 2.5 minuta u kipućoj vodi. Posle hlađenja na sobnoj temperaturi je korišćen, ili odlagan u frižider do upotrebe.

Prethodno napravljene rastvori

35% akrilamid

2% Bis

Gornji elektrodni pufer - je 1M Tris podešen na pH 6.8

Donji elektrodni pufer - je 1M Tris podešen na pH 8.8. Za podešavanje pH-vrednosti je korišćena koncentrovana HCL.

Pripremanje gela

Osamnaestoprocentni gel za razdvajanje uzorka, odnosno za razdvajanje molekula proteina velike molekulske mase je u proporciji 49.30% prethodno pripremljenog rastvora akrilamida, 3.88% prethodno pripremljenog bisakrilamida, 37.60% donjeg elektrodnog pufera i 5.67% dejonizovane vode. Posle vakumiranja je dodavano 0,05% TEMED, 2.5% APS i 1% SDS.

Gel za koncentrovanje uzoraka (stacking gel) je sadržao 1.71% akrilamida, 0,43% bisakrilamida, 2.5% gornjeg elektrodnog pufera i 14.4% dejonizovane vode. Posle degasifikacije, za polimerizaciju je dodavano još 0.2% SDS, 0.75% APS i 0.015% TEMED.

Polimerizacija separacionog gela traje 1-1.5^h, dok je gel za koncentrovanje uzoraka polimerizovan oko 1^h.

Tehnika pravljenja gela, kao i dimenzije gelova su identične postupku datom za 10% SDS PAGE elektroforezu, kojom je utvrđeno prisustvo sekalina Sec-1 u genomu pšenice (*Dimitrijević, 1997*).

Nanošenje uzoraka

Količina od 8 μ l uzoraka je nanošena iglom u otvore na gornjem gelu. Ispitivano je 15 uzoraka po gelu, od čega su 5 bili standardi sa poznatim kombinacijama podjedinica glutenina visoke molekulske težine (Neepawa, Selkirk, Fielder, Norman i Dundas). U slučaju pojavljivanja traka podjedinica glutenina koje navedeni standardi nisu imali, eksperiment je ponavljan sa drugim standardima.

Postupak elektroforeze

Vertikalna doiskontinuirana elektroforeza je rađena uz dodavanje elektrodnog pufera u donju i gornju komoru elektroforetske jedinice. Elektrodni pufer je rastvor Tris, glicina i SDS sa pH vrednošću 8.3. najčešće su rađena dva gela istovremeno u ukupnom trajanju elektroforeze od 22^h od momenta kretanja uzoraka kroz gel do izlaska fronta boje u elektrodni pufer. Sistem je hlađen na 20°C i ova temperatura je održavana sve vreme prolaska proteina kroz gel.

Jačina struje je menjana po sledećem režimu: 5mA/gel u prva dva sata, zatim 10mA/gel sledećih osamnaest sati, da bi poslednja sva sata iznosila 15mA/gel. Napon struje se kretao od oko 20V na početku do oko 150V na kraju eksperimenta.

Ispiranje gelova

Gelovi su, po postupku elektroforeze, ispirani u rastvoru od 10% TCA (trihlorsirćetna kiselina) i 33% metanola (MeOH) u dejonizovanoj vodi. Ispiranje je rađeno, uz blago mešanje, u trajanju od 1^h na 20°C. postupak ispiranja se ponavlja tri puta.

Bojenje gelova

Za bojenje gelova je korišćen PNG rastvor, koji je spravljan kao 0.2% CBB G-250 (Commassie Brilliant Blue), uz odgovarajuću količinu 1M H₂SO₄ (sumporne kiseline). posle četiri sata mešanja, ovom rastvoru je dodato 10m KOH (kalijum hidroksid) i 14% TCA. Gelovi su, uz blago mešanje, bojani 12-18^h na sobnoj temperaturi (20°C).

Ovaj postupak ne zahteva obezbojavanje gela, već samo ispiranje u tekućoj destilovanoj vodi u trajanju od oko 2 minuta.

Sušenje gelova

Gelovi su sušeni u vakuum sušionicama i to 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim 2^h na 80°C, da bi se potom hladili do sobne temperature.

Izražavanje rezultata

kombinacija podjedinica glutenina velike molekulske mase uzorka, je utvrđena poređenjem sa navedenim standardima, na svežim gelovima, ili fotografijama.

Rezultati dobijeni elektroforezom sorata pšenice su stavljeni u odnos sa rezultatima farinograma i ekstenzograma. U ovu svrhu su korišćeni podaci Savezne komisije za priznavanje sorata dati u publikacijama Komisije.

Određivanje farinograma je delimično usklađeno sa međunarodnim standardnim metodom ICC. Korišćeno je 60%-no laboratorijsko brašno mlevenog automata Buhler. Farinografska kriva je određena na testu zamešenom od 300g brašna i količine vode pri kojoj testo u maksimumu krive ima konzistenciju 500 FJ. trajanje određivanja je 15 minuta. Ocenjivani su sledeći parametri: moć upijanja vode (iskazana u procentima na 13% vlage brašna), razvoj testa u minutima (vreme od početka mešanje do maksimuma krive), stabilnost testa u minutima (vreme od maksimuma krive), stabilnost testa u minutima (vreme od maksimuma krive do njenog opadanja za 10 FJ), stepen omekšavanja testa u FJ (odstojanje krajnje tačke srednje linije dijagrama od konzistencije 500 FJ), kvalitetni broj (dobijen planimetrisanjem određenog dela površine krive).

Za određivanje ekstenzograma, u farinografu je standardnim postupkom izrađeno testo. Testo je rastezано posle 45, 90 i 135 minuta odmaranja, gde je ponašanje pri rastezanju registrovano krivom i ocenjeni su sledeći parametri: otpor na rastezanje tj. otpor rastezanja u EJ - ekstenziografskim jedinicama - (pri konstantnoj deformaciji, tj. na petom santimetru od početka krive), rastegljivost u

milimetrima (dužina krive od početka rastezanja do trenutka otkidanja testa), odnos otpora i rastegljivosti (o/r), energija u cm² (površina koju obrazuje kriva).

Sumarni pregled mera izražavanja posmatranih parametara:

Farinogram:

- Moć upijanja vode.....% na 13% vlage
- Vreme razvoja testamin.
- Stabilnostmin.
- Step en omekšavanjaFJ
- Farinografski kvalitetni broj

Ekstenziogram:

- Energija.....cm²
- Otpor rastezanjaEJ
- Rastegljivostmm
- o/r.

Tabela 1. Poređenje ispitivanih genotipova pšenice grupisanih po prisustvu podjedinica velike molekulske mase Glu-B1 lokusa. Razlike između grupa testirane su na nivou visoke statističke značajnosti (0.05) i označavane zvezdicom (). Oznake u tabeli su: $\bar{x}$ - srednja vrednost, σ - standardna devijacija i V - koeficijent varijacije (%)*

Table 1. The comparison of examined wheat genotypes, grouped according to HMW glutenin allelic variation on Glu-B1 loci. The differences between groups have been tested at the high significance level of 5% and marked with an asterisk (). Abbreviation stand for: $\bar{x}$ - mean value, σ - standard deviation, V - coefficient of variation (%).*

	Glu 7			Glu 7+9			Glu 7+8			Glu 6+8		
	$\bar{x}$	σ	V	$\bar{x}$	σ	V	$\bar{x}$	σ	V	$\bar{x}$	σ	V
Farinogram												
Moć upijanja vode Water absorption	60.63	1.28	2.12	60.99	2.55	4.18	60.48	3.96	6.55	61.77	4.16	6.74
Razvoj testa Development	2.52	1.00	39.59	2.99	1.14	38.21	2.59	0.75	29.17	2.80	0.68	24.22
Stabilnost testa Dough stability	2.68	0.94	34.97	2.98	1.56	52.29*	2.07	1.41	68.02	2.42	0.64	26.36
Step en omekšanja Degree of softening	62.67	22.01	35.12	57.95	24.74	42.70	70.93	17.23	24.29	65.71	12.57	19.12
Kvalitetni broj Quality number	63.99	7.69	12.01	68.62	10.50	15.30*	61.55	7.32	11.89	64.96	4.57	7.02
Ekstenziogram												
Energija Energy	84.22	29.63	35.18	85.67	24.88	29.04	86.57	27.56	31.84	73.83	17.21	23.31
Otpor rastez. Resistance to extension	305.89	94.06	30.75	318.48	64.02	20.10	310.57	99.34	31.99	325.83	89.47	27.46
Rastegljivost Extensibility	153.78	21.21	13.79	152.74	16.59	10.86	156.14	21.05	13.48	141.67	15.74	11.11
o/r	2.08	0.80	38.71	2.15	0.51	23.82	2.04	0.89	43.50	2.42	0.82	33.96

Obrada podataka

Podaci su statistički obrađeni testom homogenosti varijansi i t-testom upoređivanja sredina dva uzorka, kao i izračunavanjem osnovnih statističkih pokazatelja centralne tendencije (aritmetička sredina - $\bar{x}$) i varijacije (*Steel i Torrie, 1960*). Varijabilnost je iskazana standardnom devijacijom - σ , kao apsolutnim pokazateljem i koeficijentom varijacije V (%), kao relativnim pokazateljem. Za obradu podataka je korišćen program Statistica for Windows, release 4.5A, StatSoft Inc., 1993.

Rezultati sa diskusijom

Međusobno upoređivanje efekata podjedinica glutenina velike molekulske mase sa hromozoma 1B, na osobine pšenice razmatrane u radu, je izvršeno za one subjedinice 1B glutenina koje su utvrđene za veći broj genotipova, to su bile *Glu-B1 7+9* (97 genotipova), *Glu-B1 7+8* (15 genotipova), *Glu-B1 7* (10 genotipova) i *Glu-B1 6+8* (7 genotipova). Izuzete su subjedinice velike molekulske mase koje su se pojavile samo za jedan genotip i to *Glu-B1 17+18* (samo kod sorte Romanija), *Glu 20* (samo kod sorte Fruškogorka).

Uticaj podjedinica glutenina velike molekulske mase hromozoma 1B na ispitivanje svojstva testa pšenice. Prema rezultatima, nisu se ispoljile značajne razlike između grupa genotipova sa *Glu-B1 7* i onih sa kombinacijom subjedinica *Glu-B1 7+9*. Razlog, pre svega, može da bude i izrazita disproporcija u broju ispitivanih genotipova navedenih genetičkih konstitucija. Ipak, rezultati farinograma i ekstenziograma su bolji za kompoziciju *Glu-B1 7+9*, što se zbog izostanka statističke značajnosti razlika može smatrati tendencijom. Između srednjih vrednosti genotipova *Glu-B1 7* i *Glu-B1 7+8*, se nisu ispoljile značajne razlike, ni za jednu od 9 upoređivanih srednjih vrednosti, što je bio slučaj i pri komparaciji genotipova *Glu-B1 7* i *Glu-B1 6+8*. Najveći broj statistički značajnih razlika srednjih vrednosti, se pojavio u poređenju sorti i linija sa *Glu-B1 7+9* i *Glu-B1 7+8* konstitucijom subjedinica glutenina velike molekulske mase. Rezultati farinograma su bili značajno veći od genotipova *Glu-B1 7+9* ($\bar{x}=3.0\text{min}$. i $\bar{x}=68.6$, po redosledu) u odnosu na genotipove *Glu-B1 7+9* i *Glu-B1 6+8*, mada su rezultati bili bolji na nivou tendencije za *Glu-B1 7+9* genotipove. Sličan rezultat je dobijen i poređenjem genotipova *Glu-B1 7+8* i *Glu-B1 6+8*, sa prednošću kombinacija *Glu-B1 7+8*.

Prema pokazateljima varijacije, moć upijanja vode ($V=2-7\%$), je bila među najhomogenijim osobinama farinograma, dok je rastegljivost testa pokazala najmanju varijabilnost ($V=11-14\%$) u grupi osobina ekstenzograma u svim podelama genotipova pšenice po kriterijumu *Glu-B1* podjedinica.

ZAKLJUČAK

Iako postoje mišljenja da aleli prvog hromozoma pšenice, ne igraju značajnu ulogu sa stanovišta kvaliteta, prema rezultatima ovog rada, *Glu*-lokusi na

hromozomu 1B, ipak nisu sasvim malog značaja u pogledu uticaja na kvalitet hleba, ali njihov efekat treba gledati i u sklopu ukupne genetičke osnove.

U pogledu uticaja alelne varijacije Glu B1 lokusa na kvalitet, zapažena je prednost podjedinica glutenina velike molekulske mase 7+9 za reološke osobine testa, a za njima su podjedinice glutenina 7+8, koje su na nivou sa prethodnim za rezultate dobijene na ekstenzografu.

LITERATURA

- Branlard, G. and Dardevet, M. (1985): Diversity of Grain Protein and Bread Wheat Quality. II. Correlation between High Molecular Weight Subunits of Glutenin and Flour Quality Characteristics. *Journal of Cereal Science*, 3, pp. 345-354.
- Dimitrijević M. (1997): Prisustvo i efekat pšenično-ražene translokacije 1RS/1BL na karakteristike kvaliteta i prinos novosadskih visokoprinosnih sorata pšenice *Triticum aestivum* L. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univ. u Novom Sadu, N. Sad
- Lafiandra, D., D'Ovidio, R., and Margiotta, B. (1993): Study of Allelic Variation of High Molecular Weight Glutenin Subunits Genes Using Biochemical and Molecular Approaches. *Proc. of 8th Int. Wheat Gen. Symp.*, Vol. 1, Beijing, China, pp. 709-714.
- Liu, C.Y., Rathjen, A.J. (1996): Association of high and low molecular weight glutenin subunits with dough strength in durum wheats (*Triticum turgidum* ssp. *turgidum* L. conv. *durum* Desf.) in southern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 36(4), 451-458.
- Ng, P.K.W. and Bushuk, W. (1988): Statistical Relationships Between High Molecular Weight Subunits of Glutenin and Breadmaking Quality of Canadian-Grown Wheats. *Cereal Chem.*, 65(5), pp. 408-413.
- Oury, F.X., Rousset, M., Berard, P., Pluchard, P. and Doussinault, G. (1995): Bread Making Quality of Wheat Hybrids - Effect of High Molecular Weight Glutenins in a State of Heterozygosity. *Canadian Journal of Plant Science*, Vol. 75, No. 3, pp. 633-642.
- Payne, P.I. (1987): Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38, pp. 141-153.
- Randall, P.G., Manley, M., McGill, A.E.J., Taylor, J.R.N. (1993): Relationship between the high Mr subunits of glutenin in South African wheats and end-use quality. *Journal of Cereal Science*, 18(3), pp. 251-258.
- Steel, R.G.R. and Torrie, J.H. (1960): Principles and procedures of statistics. Mc GrawHill Book Company, London.
- Vapa, Ljiljana and Savić, M. (1988): The HMW glutenin subunit composition of wheat varieties bred in Yugoslavia. *Proc. Seventh Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge, pp. 1019-1023.
- Vapa, Ljiljana i Mihaljev, I. (1990): Povezanost subjedinica glutenina velike molekulske mase na parametre pekarskih kvaliteta pšenice. *Zbornik radova: Sedmi jugosl. simp. o naučno istraž. radu na pšenici, Savez društava*

genetičara Jugoslavije, izvod, Novi Sad, Savremena poljoprivreda, 38(3-4), pp. 419-422.

Vapa, Ljiljana i Radović, Dragana (1995): Ispitivanje genetičke uniformnosti semena. pšenice. Selekcija i semenarstvo, Vol II, Br. I, pp. 47-49.

THE INFLUENCE OF HMW GLUTENIN ALLELIC VARIATION ON 1B WHEAT CHROMOSOME ON RHEOLOGICAL DOUGH PROPERTIES

Dimitrijević , M., Petrović , Sefija

Faculty of Agriculture and Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

SUMMARY

A sample of 139 wheat genotypes consisted of released varieties and unreleased lines, has been examined by electrophoresis, 10% SDS-PAGE, for the allelic variation of HMW glutenin subunits coded by the genes on 1B chromosome. All the genotypes under the investigation have been grouped according to their genetic constitution in respect of HMW *Glu 1B* subunit composition and the results of rheological dough properties (farinogram and extensogram) have been compared. It appeared that wheat genotypes possessing Glu 7+9 subunit composition generally showed the best performance.

KEY WORDS: wheat, glutenin, farinogram, extensogram, electrophoresis.