

DANUTA RZEPKA-PLEVNEŠ¹**MIŁOSZ SMOLIK¹****KAROLINA LEBIECKA²**¹ Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych² Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Akademia Rolnicza w Szczecinie

Polimorfizm białek zapasowych wybranych form żyta (*Secale* sp.) określony techniką SDS-PAGE

Polymorphism of seed protein in some rye (*Secale* sp.) forms determined by SDS-PAGE electrophoresis

Badano dwie odmiany i 8 prostych i wstecznych mieszańców międzygatunkowych żyta (*Secale* sp.) różniących się między sobą odpornością na mączniaka, rdzę brunatną i porastanie. Materiał eksperymentalny stanowiły nasiona roślin tolerancyjnych i nietolerancyjnych na niedobory N i K w podłożu wyselekcjonowane z każdej wyżej wymienionej populacji żyta. Różnice genotypowe między nimi określono w oparciu o elektroforetyczny rozdział białek zapasowych techniką SDS-PAGE. Otrzymane wyniki badań wykazały wyraźne różnice w strukturze białek badanych form żyta. Polegały one na obecności lub braku specyficznych dla nich polipeptydów.

Słowa kluczowe: białko, elektroforeza, tolerancja, niedobory pokarmowe, odporność, choroby, porastanie

The investigations included two cultivars and 8 simple and backcross interspecies rye (*Secale* sp.) hybrids differing in resistance to powdery mildew, brown rust and sprouting. Experimental material consisted of the seeds of plants tolerant and non-tolerant to N and K deficiencies, selected from above mentioned rye populations. The usual SDS-PAGE electrophoresis of storage proteins was used for determining genetic differences between them. The results showed genetic differences between the tested rye genotypes. Marked differences in protein structure, shown in the presence of polypeptides specific for each genotype, were found.

Key words: protein, electrophoresis, tolerance, nutrition, deficit, resistance, disease, sprouting

WSTĘP

Żyto *Secale cereale* L. wyróżnia się wśród zbóż wieloma cennymi z punktu widzenia hodowli właściwościami (Jagodziński, Rakowska, 1996). Stąd w programach hodowli tej rośliny dąży się do ich zachowania i utrzymania wysokiego potencjału plonowania, przy niższym od obecnie stosowanego poziomie nawożenia mineralnego (Ciepły i in., 1999). Jest to możliwe, wówczas gdy hodowca dysponuje odpowiednim materiałem wyjściowym,

dobrze przekazującym cechy potomstwu, a selekcję prowadzi się o sprawdzone kryteria (Węgrzyn, 1988). W przypadku żyta, podobnie jak i innych zbóż, może nim być długość korzeni zarodkowych (Górny, 1992; Rzepka-Plevneš, 1999). Jednak szansę wyboru przez hodowcę właściwego genotypu dają dopiero techniki biologii molekularnej, a wśród nich elektroforetyczna analiza białek zapasowych (Drzewiecki, 1997; Waga, Węgrzyn, 2000).

Celem pracy była ocena stopnia zróżnicowania białek zapasowych wybranych form żyta różniących się tolerancją na niedobory azotu i potasu w podłożu oraz odpornością na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną żyta.

MATERIAŁ I METODY

Badano dwie populacyjne odmiany żyta — Dańkowskie Złote i Motto oraz 8 prostych i wstecznych mieszańców międzygatunkowych *Secale* sp., różniących się między sobą odpornością na mączniaka prawdziwego (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *secalis* Marchal), rdzę brunatną żyta (*Puccinia graminis* Pers. f. *secalis* Eriks et Henn.) i porastanie (tab. 1).

Tabela 1

Pochodzenie badanych mieszańców międzygatunkowych żyta
Parentage of the tested rye interspecies hybrids

Mieszańce Hybrids	Kombinacja krzyżowań Cross combination	Pokolenie Generation	Cecha Trait
M-1/1	(Dańkowskie Złote × BFK*) × Dańkowskie Złote	BC ₅	odporność na mączniaka prawdziwego resistance to powdery mildew
M-4/1	(Halo × BFK) × Dańkowskie Złote	BC ₅	
M-7/2	(Tempo × 715/81**) × Motto	BC ₅	
M-8/2	(Kustro × 715/81) × Motto	BC ₅	
84/18	Pastewne Późne × <i>S. kuprijanovii</i>	S ₁₆	
RB-3/91	Dańkowskie Selekcyjne × <i>S. montanum</i>	BC ₂	odporność na rdzę brunatną resistance to brown rust
RB-4/91	Dańkowskie Selekcyjne × <i>S. montanum</i>	BC ₂	
8486/31	(Kunngs II × <i>S. vavilovii</i>) × Halo	BC ₂	odporność na porastanie resistance to sprouting

* BFK — Bernburger Futterroggen × *Secale kuprijanovii*

** 715/81 — linia żyta, z udziałem *S. kuprijanovii*, *S. cereale* cv. Smolickie oraz *S. cereale* KaH.

** Rye line with genotypes *S. kuprijanovii*, *S. cereale* cv. Smolickie and *S. cereale* KaH.

Nasiona odmian pochodziły z Hodowli Roślin „Danko”, Oddziału w Choryni, mieszańców — z kolekcji własnej (Rzepka-Plevneš, 1990).

Przed przystąpieniem do analizy polimorfizmu białek zapasowych określono tolerancję wymienionych form żyta na niedobory azotu i potasu w podłożu testem *in vitro* (Rzepka-Plevneš, 1999). Podstawą oceny tolerancji były pomiary biometryczne 10 dniowych siewek, przy czym za tolerancyjne uważano siewki o wysokości 5 i powyżej 5 cm, z dobrze wykształconymi korzeniami zarodkowymi i liśćmi, za nietolerancyjne — siewki o wysokości poniżej 2 cm, bez lub ze słabo wykształconymi korzeniami. Siewki obu grup roślin wysadzono w hali wegetacyjnej i rozmnożono w chowie siostrzanym, a zebrane z nich nasiona wykorzystano do dalszych badań.

Polimorfizm białek zapasowych wymienionych form żyta badano w oparciu o elektroforezę SDS-PAGE (Kapała i Rybiński, 1996; Westermeier, 1993). Białko do analiz ekstrahowano z mąki otrzymanej z przemiału 20 ziarniaków każdej z badanych form żyta. Do izolacji białka z próby użyto 400 μ l 70% etanolu i mieszano je z buforem ekstrakcyjnym składającym się z: ddH₂O, 0,5 M Tris-HCl, o pH 6,8, gliceryny, 10% (w/v) SDS, 2-mercaptoetanolu i 1% błękitu bromofenolowego w ilości, odpowiednio: 15,2; 4,0; 3,20; 6,40; 1,60 i 1,60 ml.

Elektroforezę prowadzono w układzie nieciągłym, na dwóch rodzajach żeli akrylamidowych, zagęszczającym (4%) i rozdzielającym (12,5%), o grubości 1 mm na aparatach Mini Protean II (Bio Rad) i Multiphor II (Pharmacia LKB) w trzech powtórzeniach. Otrzymane elektroforegramy barwiono Coomassie R — 250 i odbarwiano w roztworze 10% etanolu i 20% kwasu octowego. Wysuszone żele analizowano w świetle przechodzącym skanera Sharp JX — 350 i opracowywano przy użyciu pakietu programu komputerowego „Diversity one” 1.3 (Pharmacia LKB).

WYNIKI

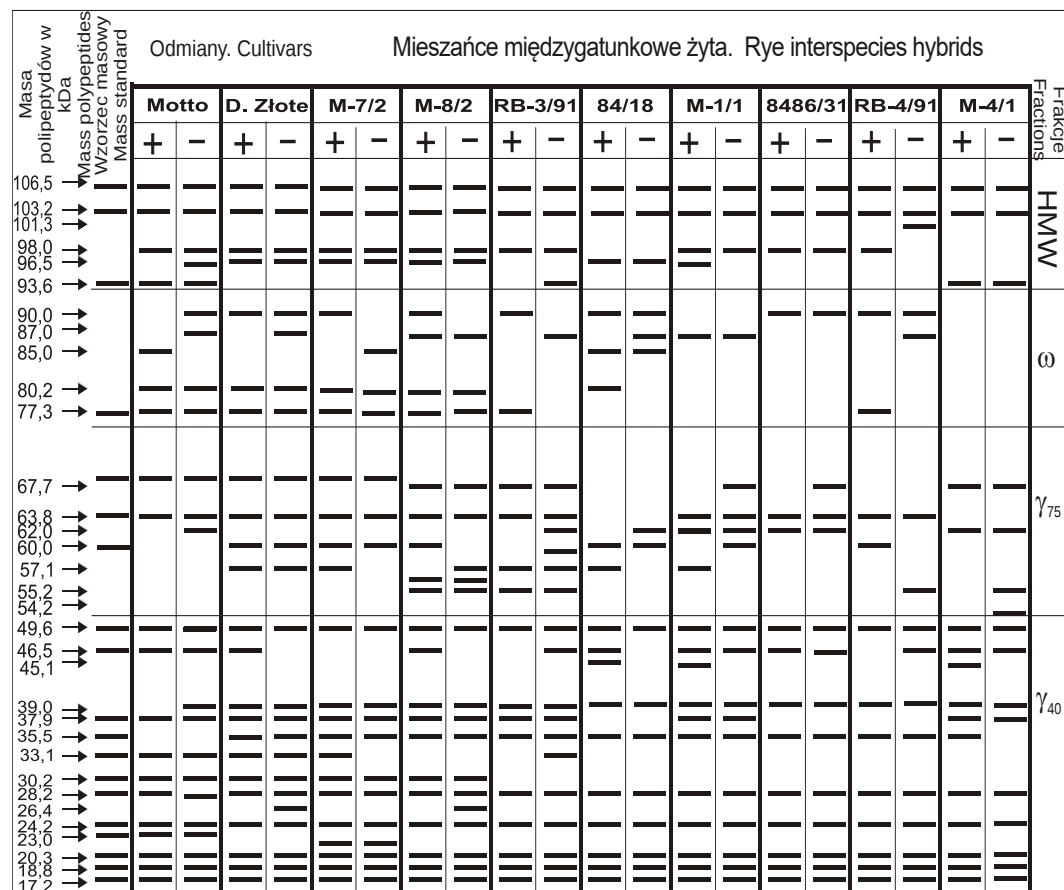
Elektroforetyczna analiza białek zapasowych wybranych form żyta wykazała duże zróżnicowanie w ich budowie (rys. 1). Polimorfizm dotyczył liczby i masy prążków białkowych. Zidentyfikowano od 15 do 24 prążków, najwięcej — w grupie roślin nietolerancyjnych wyselekcjonowanych z odmiany Dańkowskie Złote i tolerancyjnych z mieszańca M-8/2, najmniej — u roślin tolerancyjnych wyselekcjonowanych z mieszańców 8486/31 i RB-4/91. Obserwowane na żelach polipeptydy zaliczono do czterech frakcji: HMW, ω , γ 75 i γ 40. U większości badanych form żyta we frakcji HMW wyróżniono 2 prążki, we frakcji ω — od 1 do 7 prążków, we frakcjach γ 75 i γ 40, odpowiednio: od 3 do 8 i od 7 do 11 prążków.

Porównując polimorfizm białek zapasowych badanych form żyta w zależności od ich tolerancji na niedobory azotu i potasu w podłożu stwierdzono, że u roślin nietolerancyjnych wyselekcjonowanych z odmiany Motto obok 19 powtarzających się w obu grupach roślin polipeptydów obserwowano 5 dodatkowych prążków, u roślin tolerancyjnych — jeden o masie 85,0 kDa (rys. 1). Z kolei rośliny tolerancyjne pochodzące od odmiany Dańkowskie Złote charakteryzował jeden polipeptyd o masie 46,5 kDa, nietolerancyjne — dwa, o masie 87,0 i 26,4 kDa.

Podobne do odmian różnice w strukturze białek zapasowych obu omawianych grup roślin stwierdzono u mieszańców żyta odpornych na mączniaka. I tak, na obrazach elektroforetycznych roślin tolerancyjnych mieszańca M-7/2 widoczne były trzy specyficzne dla nich prążki, nietolerancyjnych — jeden, o masie 85 kDa. U mieszańca M-8/2 zidentyfikowano 5 różnicujących genotypy polipeptydów. Trzy z nich, o masie 90,0, 60,0 i 45,1 kDa obserwowano u roślin tolerancyjnych, dwa o masie 57,1 i 26,4 kDa — u roślin nietolerancyjnych. Podobne różnice stwierdzono u mieszańca M-1/1 (rys. 1).

Rozdziały elektroforetyczne białek izolowanych z roślin tolerancyjnych i nietolerancyjnych wyselekcjonowanych z mieszańców RB-3/91 i RB-4/91 odpornych na rdzę wykazały obecność u nich, odpowiednio 7 i 6 specyficznych polipeptydów, u roślin

tolerancyjnych — dwa prążki, nietolerancyjnych — pięć. U roślin tolerancyjnych drugiego z wymienionych mieszańców widoczne były dwa dodatkowe prążki, o masie 96,5 i 60,0 kDa, roślin nietolerancyjnych — prążki o masach: 101,3, 87,0, 55,2 i 46,1 kDa. Najmniejsze różnice w strukturze białek zapasowych roślin tolerancyjnych i nietolerancyjnych stwierdzono u mieszańca 8486/31 odpornego na porastanie. Różniły się one jednym charakterystycznym tylko dla danej grupy polipeptydem (rys. 1).



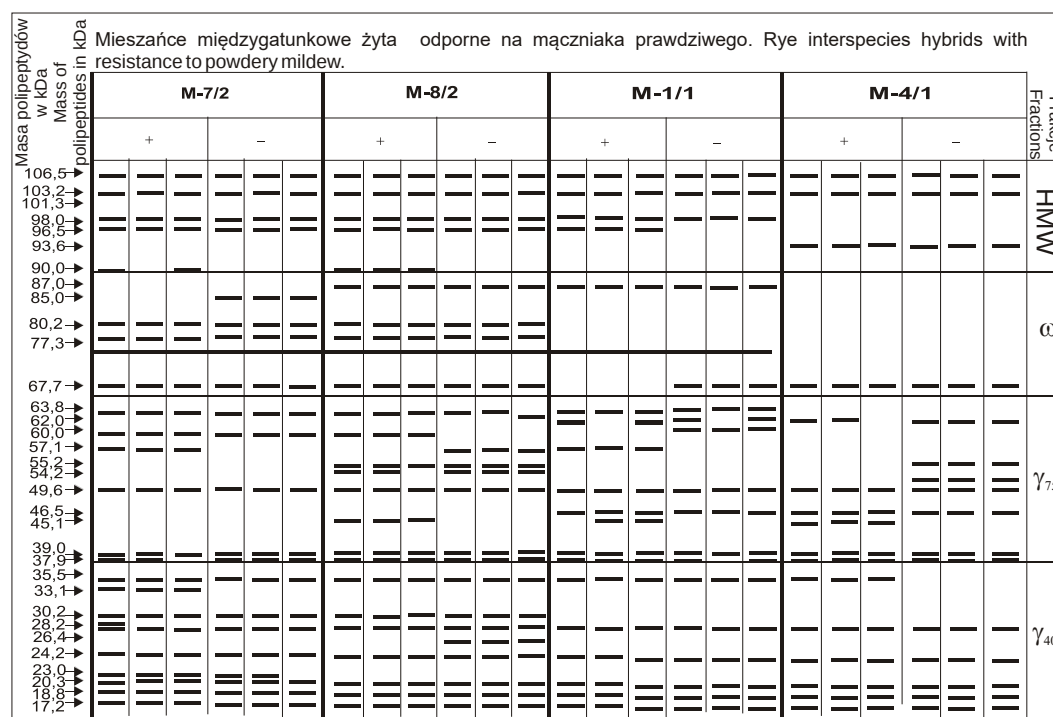
Rys. 1. Obrazy elektroforetyczne białek zapasowych form żyta tolerancyjnych (+) lub nietolerancyjnych (-) na niedobory pokarmowe w podłożu

Fig. 1. Electrophoretic protein patterns of tested rye forms with tolerance (+) or no-tolerance (-) to nutrient deficiency in medium

Obecność specyficznych prążków białkowych charakterystycznych tylko dla roślin tolerancyjnych lub nietolerancyjnych żyta pozwoliła podzielić je na trzy grupy. Do pierwszej grupy zaliczono odmiany żyta oraz mieszańce RB-3/91, RB-4/91 i 84/18, do drugiej — mieszańce RB-3/91 i RB-4/91, do trzeciej — cztery mieszańce odporne na mączniaka prawdziwego — M-1/1, M-4/1, M-7/2 i M-8/2 (rys. 1). W pierwszej grupie we

frakcji białek ω stwierdzono obecność charakterystycznego dla roślin nietolerancyjnych specyficznego prążka o masie 87,0 kDa, w drugiej — u roślin tolerancyjnych obecność prążka o masie 77,3 kDa. W trzeciej zaś grupie roślin we frakcjach białek ω i γ_{75} roślin tolerancyjnych na niedobory pokarmowe obserwowano dwa powtarzające się prążki o masach 90,0 i 45,1 kDa.

Analiza elektroforetyczna białek zapasowych roślin tolerancyjnych na niedobory pokarmowe mieszańców M-1/1, M-4/1, M-7/2 i M-8/2 odpornych na mączniaka prawdziwego wykazała pewną zależność między obu tymi cechami w postaci widocznych na obrazach elektroforetycznych dwóch polipeptydów o masach 90,0 i 45,1 kDa (rys. 2). Podobną zależność w postaci prążka o masie 87,0 stwierdzono między brakiem tolerancji na niedobory pokarmowe a odpornością roślin na rdzę brunatną żyta.



Rys. 2. Obrazy elektroforetyczne białek zapasowych form żyta odpornych na mączniaka tolerancyjnych (+) lub nietolerancyjnych (-) na niedobory pokarmowe w podłożu

Fig. 2. Electrophoretic protein patterns of rye forms resistant to powdery mildew with tolerance (+) or no-tolerance (-) to nutrient deficit in medium

DYSKUSJA

Obecny sposób klasyfikacji białek zapasowych łączy w sobie niektóre elementy dwóch systemów ich identyfikacji — czynników genetycznych i dużej precyzji określania względnych pozycji prążków białkowych na żelu (Waga 2000). Stąd ocena na drodze

rozdziałów elektroforetycznych ich polimorfizmu pozwala różnicować i charakteryzować genotypy wielu gatunków roślin uprawnych (Waga i Grzywa, 1995; Drzewiecki, 1997; Hegde i Singhal, 2000).

W niniejszej pracy dokonano oceny zmienności białek zapasowych 10 form żyta *Secale* sp. różniących się tolerancją na niedobory azotu i potasu w podłożu oraz dodatkowo: odpornością na mączniaka prawdziwego (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *secalis* Marchal), rdzę brunatną żyta (*Puccinia dispersa* Eriks. et Henn.) i porastanie. W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano istotny polimorfizm badanych form żyta. Przejawiał się on odmienną liczbą i masą widocznych na elektroforegramach prążków. Wysoki stopień zmienności badanych sekalin umożliwił opracowanie dla nich schematycznych bloków białkowych z zaznaczeniem zarówno tych podobnych, jak i tych specyficznych tylko dla danego genotypu. Otrzymane wyniki pozostają w zgodności z wynikami badań innych autorów (Waga, 1997; Drzewiecki, 1997; Smolik, 2001).

Obrazy elektroforetyczne białek zapasowych roślin tolerancyjnych i nietolerancyjnych na niedobory pokarmowe w podłożu różniły się liczbą i masą wyodrębnionych na nich polipeptydów. Obok prążków wspólnych, powtarzających się u obu grup roślin obecne były tam również prążki charakterystyczne tylko dla danej grupy. Ich liczba i masa była różna i zależała od pochodzenia badanych prób białkowych. Najmniejszy polimorfizm dotyczący liczby wyodrębnionych polipeptydów różnicujących grupy roślin tolerancyjnych i nietolerancyjnych na niedobory N i K w podłożu stwierdzono dla próby białek izolowanych z mieszańca 8486/31 odpornego na porastanie.

Waga i Grzywa, (1995) wykazali powiązanie białek hordeinowych izolowanych z jęczmienia jarego z jego odpornością na mączniaka prawdziwego (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). U użytych w niniejszych badaniach własnych źródeł odporności na mączniaka prawdziwego (Rzepka-Plevneš, 1990) w grupie roślin tolerancyjnych na niedobory azotu i potasu zidentyfikowano dwa prążki białkowe o masie 90,0 i 45,1 kDa, mogące świadczyć o pewnej zależności między wymienionymi cechami żyta. Podobną zależność w postaci prążka o masie 87,0 kDa stwierdzono między brakiem tolerancji na niedobory pokarmowe w podłożu a odpornością mieszańców na rdzę brunatną żyta.

WNIOSKI

1. Uzyskane metodą SDS-PAGE obrazy elektroforetyczne sekalin pozwalają określić zróżnicowanie genetyczne wybranych do badań form mieszańcowych żyta.
2. Na podstawie oceny polimorfizmu białek zapasowych roślin tolerancyjnych i nietolerancyjnych na niedobory azotu i potasu w podłożu podzielono badane formy żyta na trzy grupy podobieństwa genetycznego. Pierwszą grupę stanowiły rośliny nietolerancyjne wyselekcjonowane z odmian Dańkowskie Złote i Motto oraz mieszańców międzygatunkowych: RB-3/91, RB-4/91 i 84/18, drugą — rośliny tolerancyjne wyselekcjonowane z mieszańców RB-3/91 i RB-4/91, trzecią — rośliny tolerancyjne wyselekcjonowane z mieszańców odpornych na mączniaka prawdziwego (M-1/1, M-4/1, M-7/2 i M-8/2).

3. Wykazano obecność dwóch wspólnych prążków białkowych (90,0 i 45,1 kDa) u mieszańców międzygatunkowych żyta charakteryzujących się odpornością na mączniaka prawdziwego i tolerancją na niedobory pokarmowe w podłożu oraz jednego o masie 87,0 kDa — u mieszańców odpornych na rdzę brunatną i nietolerancyjnych na niedobory pokarmowe.

LITERATURA

- Cieplý J., Oracka T., Kozdój J. 1999. Możliwości hodowli zbóż efektywniej wykorzystujących składniki mineralne. Biul. IHAR 211: 13 — 21.
- Drzewiecki J. 1997. Ocena tożsamości roślin rolniczych na podstawie nasion i siewek — stan obecny i nowe kierunki. Biul. IHAR 203: 13 — 21.
- Górny A. G. 1992. Genetic variation of the root system in spring barley and oat. Rozpr. hab. Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Science, Poznań.
- Hegde V. S., Singhal N. C. 2000. Identification and cluster analysis of Indian bread wheat varieties by acid PAGE of gliadin marker. Plant Varieties and Seeds 13: 1 — 3.
- Jagodziński J., Rakowska M. 1996. Wartość żywieniowa ziarna linii wsobnych i mieszańców żyta. Biul. IHAR 200: 119 — 124.
- Kapała A., Rybiński W. 1996. Genetic variation of hordein polypeptides in grains of mutants of hull-less spring barley (*Hordeum vulgare* L.) breeding lines. Genet. Pol. 37 (1): 29 — 35.
- Rzepka-Plevneš D. 1990. Studia nad mieszańcami międzygatunkowymi *Secale* sp. pod kątem przydatności niektórych ich cech w hodowli żyta *Secale cereale* L. Rozpr. hab. Zesz. Nauk. AR Szczecin.
- Smolik M. 2001. Zmienność genotypów żyta *Secale cereale* L. o różnej tolerancyjności na niedobory pokarmowe w podłożu. Praca doktorska: 41 — 97.
- Waga J., Grzywa M. 1995. Powiązanie białek hordeinowych z odpornością na mączniaka prawdziwego (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) jęczmienia jarego. Hod. Rośl. Aklim. 39/ 6: 41 49.
- Waga J. 1997. Białka gliadynowe i ich rola w hodowli pszenic. Biul. IHAR. 164: 181 — 188.
- Waga J., Węgrzyn S. 2000. Powiązanie wybranych frakcji białek gliadynowych ze zmiennością cech użytkowych odmian i rodów pszenicy ozimej. Biul. IHAR. 215: 61 — 76.
- Westermeier R. (ed.). 1993. Electrophoresis in practice, VCH: 275.