

JACEK WAGA**HELENA GRZESIK**

Zakład Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Krakowie

Analiza elektroforetyczna białek zapasowych kilku rodów pszenżyta ozimego odpornych na porastanie

Electrophoretic analysis of storage proteins in some winter triticale strains resistant to preharvest sprouting

Analizowano polimorfizm białek zapasowych wybranych rodów pszenżyta ozimego, odpornych na przedźniwne porastanie ziarna, w porównaniu z odmianą wzorcową Bogo wykazującą dużą skłonność do porastania. Zaobserwowano różnice w składzie podjednostek białek zapasowych zarówno gliadyn, jak i glutenin pomiędzy odpornymi na porastanie rodami i porastającą odmianą Bogo. Różnice te mogą być genetycznie powiązane ze zmiennością badanej cechy, co sugeruje możliwość wykorzystania ich jako biochemicznych markerów porastania.

Słowa kluczowe: analiza elektroforetyczna, białka zapasowe, przedźniwne porastanie, pszenżyto

The polymorphism of storage proteins was analyzed in some strains of winter triticale resistant to preharvest sprouting, in comparison with susceptible to sprouting variety Bogo. Based on the electrophoretic analysis differences in subunits composition of storage proteins were observed between the resistant to sprouting strains and the Bogo variety with regard to both gliadins and glutenins. These differences may be genetically associated with variability of the studied trait. It suggests a possibility of using them as biochemical markers of preharvest sprouting.

Key words: electrophoretic analysis, preharvest sprouting, storage proteins, triticale

WSTĘP

W warunkach klimatycznych Polski odporność na porastanie zbóż ma bardzo duże znaczenie. Według Tarkowskiego (1978), Węgrzyna i wsp. (1991), Weidner (1992) przeciętnie w roku porastanie występuje na 5–10% plantacji (dane szacunkowe). Straty wywołane porastaniem przedźniwnym w kłosach są bardzo duże i choć trudno je dokładniej ocenić ogólnie można powiedzieć, że są to zarówno straty ilościowe, jak i jakościowe — obniża się wartość siewna i technologiczna ziarniaków (Wahl i Rourke, 1992; Moś, 2003; Moś i Wójtowicz, 2002).

Odporność na porastanie jest cechą złożoną, zależną od genotypu rośliny (odmiany) i w dużym stopniu od interakcji genotypu ze środowiskiem, zwłaszcza od przebiegu pogody w okresie dojrzwania ziarna i zbioru roślin. Zwracają na to uwagę również Doliński (1995) oraz Derycke i wsp. (2002). Wpływ czynników abiotycznych (światła, wody i temperatury) na przedźniwne porastanie pszenżyta opisują również Shishlova i Shishlova (2002).

Pomimo bardzo licznych badań odporności na porastanie mechanizm powstawania tej cechy, do tej pory, nie został wyjaśniony. Jak podaje Moś (1994) wielu autorów podkreśla znaczną rolę stanu spoczynkowego ziarniaków oraz podwyższonej aktywności alfa amylazy w występowaniu tego zjawiska. Według Flinthan i Gale (1982) oraz Gale i wsp. (1988) odporność na porastanie wiąże się z genami karłowatości *Rht₃*, które wpływają hamująco na aktywność alfa amylazy. Geny te zlokalizowane są na chromosomie 4B — dawny 4A (Morris i in., 1972). Geny warunkujące odporność na porastanie znajdują się na wielu chromosomach, a według Zanettiego i wsp. (2000) głównie na chromosomach 2A, 5A, 6A i 7B. Rybka i Małuszyńska (2002), oceniając porastanie substytucyjnych linii pszenżyta odmiany Presto, sugerują, że geny warunkujące odporność na porastanie mogą być zlokalizowane na chromosomie 3R. Obecnie podejmowane są próby rozwiązania problemu odporności na porastanie z wykorzystaniem technik biologii molekularnej: poszukiwanie markerów molekularnych, mapowanie genów, QTL, poszukiwanie powiązania genów warunkujących zawartość białka z genami warunkującymi odporność na porastanie (między innymi Varshney i in., 2001).

W niniejszej pracy analizowano polimorfizm białek zapasowych wybranych rodów pszenżyta ozimego w porównaniu z wzorcową odmianą Bogo. Celem badań było stwierdzenie, które spośród zidentyfikowanych frakcji białkowych mogą być wykorzystane w charakterze biochemicznych markerów porastania.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły rody pszenżyta ozimego odporne na porastanie (powyżej 6 w skali 9-stopniowej) oraz porastająca odmiana Bogo. Wspomniane rody pszenżyta uzyskano w Zakładzie Roślin Zbożowych IHAR w Krakowie (Grzesik, 2002).

Odporność na porastanie oznaczano metodą Schmidta (cyt. za Ruebenbauer i Brej, 1957) z wykorzystaniem skali bonitacyjnej od 9 do 1, (9 — oznacza całkowitą odporność, 1 — całkowite porośnięcie). Bonitację prowadzono po 3, 6 i 9 dniach, a uzyskane wyniki sprowadzano do jednej wartości (Węgrzyn i in., 1991). Liczbę sedymentacji oznaczano metodą Zeleny'ego-Greenwaya (1960), a zawartość białka metodą spektrofotometryczną w bliskiej podczerwieni (NIR — near infra-red spectroscopy).

Gliadyny analizowano metodą elektroforezy kwaśnej (A PAGE) w środowisku buforu mleczanowo-glinowego pH = 3,1, natomiast gluteniny elektroforezą w środowisku zasadowym z dodatkiem soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS PAGE) (Laemmli, 1970; Bushuk i Zilmann, 1978). Analizowano po 20 ziarniaków każdej badanej formy.

WYNIKI I DYSKUSJA

Średnie wartości oceny porastania, liczby sedymentacji i zawartości białka, zakres oraz współczynniki zmienności tych cech dla badanych rodów pszenżyta, a także odmiany Bogo zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Średnie, zakresy i współczynniki zmienności (CV%) porastania, liczby sedymentacji i białka kilku rodów pszenżyta ozimego w latach 1994–2000

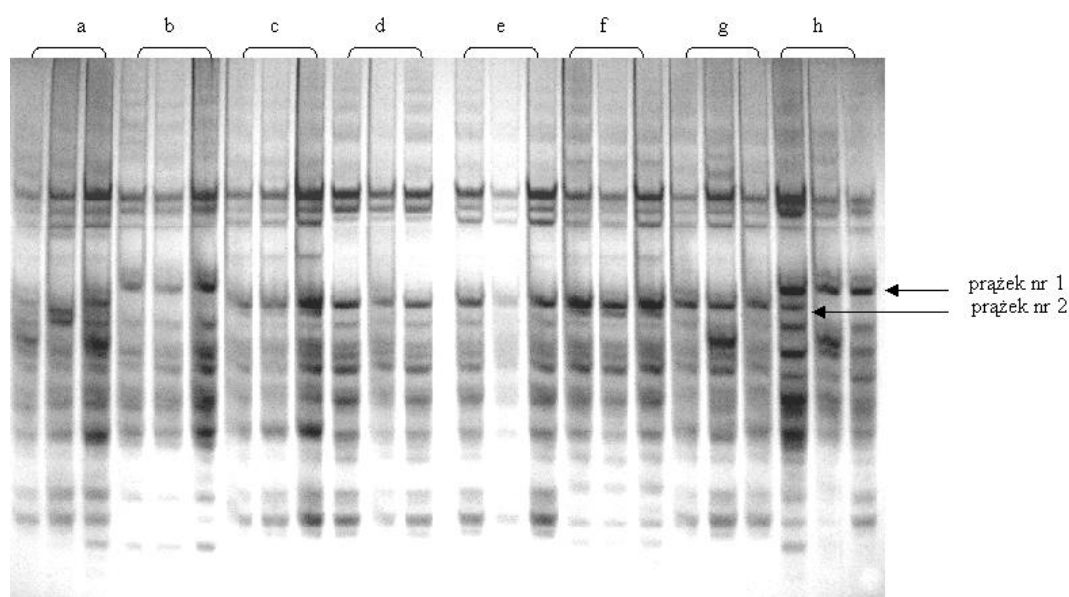
Mean values, range of variability and coefficients of variability (CV%) of preharvest sprouting, sedimentation value and protein content of some winter triticale strains in 1994–2000

Ród Strain	Porastanie Preharvest sprouting			Liczba sedymentacji Sedimentation value			Białko Protein content		
	średnia mean	zakres range	CV%	średnia mean	zakres range	CV%	średnia mean	zakres range	CV%
Tm 103/2000	6,3	5,0–7,3	13,4	18,2	15–22	17,1	11,6	8,8–14,0	17,0
Tm 107/2000	6,9	4,0–8,2	25,3	18,6	15–23	15,5	11,6	10,7–13,0	7,0
Tm 108/3/2000	6,2	3,0–8,2	31,9	14,9	8–19	24,1	11,2	7,7–13,7	20,1
Tm 109/1/2000	7,3	5,6–8,2	14,8	17,9	13–21	15,0	11,1	8,6–14,2	16,2
Tm 109/3/2000	6,7	5,4–7,7	13,0	14,3	9–19	26,1	10,8	8,6–13,1	14,6
Tm 111/2000	7,4	5,9–8,2	11,5	17,7	13–20	14,1	11,0	8,6–13,7	15,1
Bogo	2,7	1,5–3,5	17,1	17,0	13–20	15,0	11,6	10,0–13,7	13,3

Analizując wyniki oznaczeń wykonanych w latach 1994 do 2000 można zauważyć, że w przypadku porastania największą zmienność w latach wykazywał ród Tm 108/3/2000 — współczynnik zmienności (CV%) wynosił 31,9, a następnie Tm 107/2000 (CV% — 25,3), najmniejszą zaś, ród Tm 111/2000 (CV% — 11,5). Ocena liczby sedymentacji najbardziej różniła się w przypadku rodów Tm 109/3/2000 i Tm 108/3/2000 — współczynniki zmienności CV% wynosiły odpowiednio 26,1 i 24,1. Największą zmienność zawartości białka wykazywał ród Tm 108/3/2000 (CV% — 20,1), a najmniejszą ród Tm 107/2000 (CV% — 7,0). Wyniki te są zbliżone do wyników opisanych we wcześniejszych pracach (Węgrzyn i in., 1998; Grzesik i in., 2001; Grzesik i in., 2003). Zmienność tych cech w latach wydaje się zrozumiała, gdyż omawiane cechy są silnie modyfikowane przez warunki środowiska, a zwłaszcza przez warunki pogodowe.

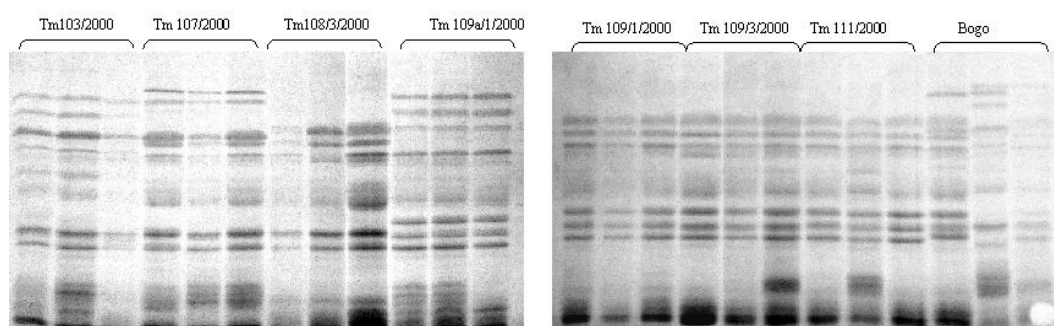
Analiza elektroforetyczna białek zapasowych wykazała zróżnicowanie badanych form pszenżyta ozimego zarówno pod względem gliadyn, jak i glutenin wysokocząsteczkowych. Wyraźne różnice obserwowano pomiędzy odmianą Bogo, a odpornymi na porastanie rodami pszenżyta (rys. 1 i 2). Uwagę zwraca fakt, iż Bogo stanowi formę wieloliniową — składa się ona z trzech biotypów. Na obrazach przedstawiono charakterystyczne dla nich kombinacje prążków elektroforetycznych.

W przypadku białek gliadynowych obserwowano polimorfizm wewnątrzliniowy (zróżnicowanie obrazów elektroforetycznych pojedynczych ziarniaków w obrębie jednego genotypu) dla rodów Tm 103/2000 oraz Tm 111/2000. Pozostałe rody były liniami czystymi pod względem genów kodujących gliadyny.



Rys. 1. Obraz prolamin monomerycznych wybranych rodów pszenżyta ozimego odpornych na porastanie oraz porastającej odmiany Bogo (a. Tm 103/2000, b. Tm 107/2000, c. Tm 108/3/2000, d. Tm 109a/1/2000, e. Tm109/1/2000, f. Tm 109/3/2000, g. Tm 111/2000, h. Bogo)

Fig. 1. Electrophoregrams of monomeric prolamins of some witer triticales strains resistant to sprouting and variety Bogo susceptible to sprouting



Rys. 2. Obraz glutenin wysokocząsteczkowych wybranych rodów pszenżyta ozimego odpornych na porastanie oraz porastającej odmiany Bogo

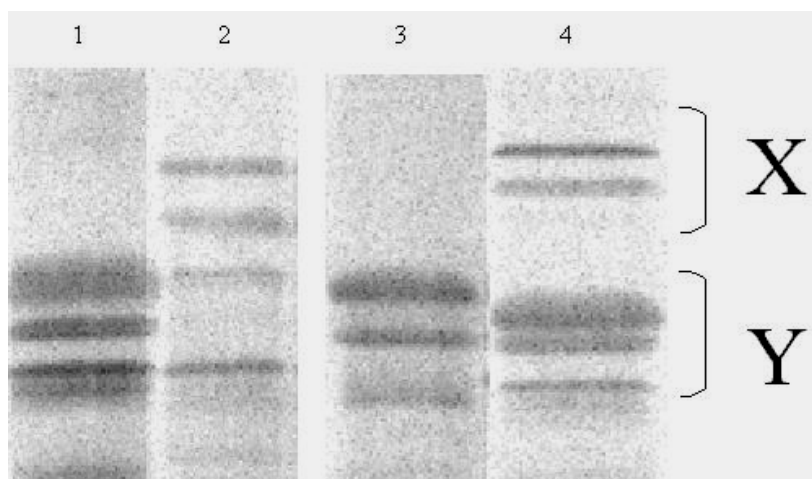
Fig. 2. Electrophoregrams of high molecular glutenin subunits of some witer triticales strains resistant to sprouting and variety Bogo susceptible to sprouting

Różnice między odmianą Bogo, a rodami odpornymi na porastanie obserwowano w środkowej strefie obrazu elektroforetycznego, w której zlokalizowane są prążki należące do grupy γ -gliadyn. Dwa spośród trzech zidentyfikowanych biotypów odmiany Bogo nie zawierały prążka oznaczonego numerem 2, który występował we wszystkich rodach z wyjątkiem rodu Tm 107/2000. Ród ten podobnie jak dwa wspomniane biotypy odmiany

Bogo zawierał prążek oznaczony jako 1. Z kolei trzeci biotyp tej odmiany zawierał kombinację obu rozpatrywanych gliadyn: 1 + 2. Polimorficzny ród Tm 103/2000 zawierał odmienne od opisanych kombinacje gliadyn w tej strefie obrazu elektroforetycznego. W przypadku pszenicy Varshney i wsp. (2001) zidentyfikowali loci molekularnych markerów: jeden (Xwmc41) związany z zawartością białka w ziarnie był zlokalizowany na chromosomie 2DL i dwa (Xwmc104 i Xmst101) związane z przedźniwnym porastaniem były zlokalizowane odpowiednio na chromosomach 6BS i 7DL. Biorąc pod uwagę, że loci niektórych γ -gliadyn są zlokalizowane na chromosomie 6BS (Payne, 1984) obserwowane zróżnicowanie mogłoby sugerować powiązanie białek zapasowych typu γ -gliadyn z porastaniem.

W nieco niżej położonej strefie obrazu elektroforetycznego zajmowanej przez białka z grupy β -gliadyn również obserwowano różnice pomiędzy badanymi formami triticales. Rody Tm 108/3/200, Tm 109a/1/2000, Tm 109/1/2000, Tm 109/3/2000 zawierają charakterystyczną kombinację trzech prążków, której nie obserwowano w żadnej z pozostałych badanych form.

W przypadku glutenin wysokocząsteczkowych polimorfizm wewnątrz linii obserwowano tylko w odmianie Bogo. Pozostałe rody były jednolite. Wyraźne różnice można obserwować między wzorcami elektroforetycznymi Bogo, a rodami odpornymi na porastanie. Charakterystycznym elementem różnicującym badane formy pszenżyta jest obecność lub brak podjednostek typu "X", co może wiązać się z właściwościami technologicznymi badanych genotypów (rys. 3).



Rys. 3. Podjednostki typu „X” oraz „Y” glutenin wysokocząsteczkowych obserwowane w wybranych formach pszenżyta ozimego (1.Tm108/3/2000, 2. Tm 109a/1/2000, 3. Tm 109/1/2000, 4. Tm 107/2000)
Fig. 3. The „X” and „Y” type high molecular weight glutenin subunits observed in some winter triticales forms

Gluteniny wysokocząsteczkowe są kodowane genami zlokalizowanymi na chromosomach 1A, 1B i 1D. Każdy z tych genów tworzy serie alleli wielokrotnych. W przypadku odmian

i rodów pszenicy większość allelicznych wariantów z grupy chromosomu 1B i 1D koduje po dwie podjednostki białkowe różniące się ciężarem cząsteczkowym. Cięższe określane są literą "X", natomiast lżejsze — "Y". Stwierdzono, że gluteniny typu "X" w większym stopniu decydują o korzystnych cechach jakościowych genotypu niż "Y". Cechą charakterystyczną pszenicy jest obecność podjednostek "X" i "Y", z kolei obraz elektroforetyczny żyta składa się tylko z podjednostek "Y". Ten fakt decyduje, między innymi, o unikalnych właściwościach technologicznych pszenicy (Kączkowski, 2002). Można więc przypuszczać, że zróżnicowanie badanych rodów pszenżyta pod względem obecności lub braku glutenin typu "X" może mieć wpływ na ich właściwości wypiekowe mąki. Częściowo przemawiają za tym wstępne wyniki analiz technologicznych (tab. 1).

PODSUMOWANIE

1. Zaobserwowano różnice w składzie podjednostek białek zapasowych zarówno gliadyn, jak i glutenin między rodami odpornymi na porastanie (Tm108/3/2000, Tm 109a/1/2000, Tm 109/1/2000, Tm 109/3/2000 oraz Tm111/2000), a porastającą odmianą Bogo. Różnice te są warunkowane genetycznie i mogą być powiązane ze zmiennością badanej cechy, co sugeruje możliwość wykorzystania ich jako biochemicznych markerów porastania.
2. Badane rody są zróżnicowane pod względem obecności lub braku cięższych frakcji glutenin typu "X", co może wiązać się z ich wartością technologiczną.

LITERATURA

- Bushuk W., Zillman R. R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. Can. J. Plant Sci. 58: 505 — 515.
- Derycke V., Haesaert G., Latre J., Struik P. C. 2002. Relation between laboratory sprouting resistance test and field observations in triticale (*X Triticosecale* Wittmack) genotypes. Proc. of 5th International Triticale Symposium, Radzików, Poland, vol. I: 123 — 133.
- Doliński R. 1995. Ocena polskich odmian uprawnych i rodów hodowlanych heksaploidalnego ozimego pszenżyta pod względem odporności na porastanie. Biul. IHAR 195/196: 147 — 158.
- Flinthan I. E., Gale M. D. 1982. The Tom Thumb dwarfing gene *Rht3* in wheat. I Reduced preharvest sprouting damage to bread making quality. Theor Appl. Genet. 62: 121 — 126.
- Gale M. D., Salter A. M., Curtis F. C., Angus W. J. 1988. The exploitation of the Tom Thumb dwarfing gene, *Rht3*, in F₁ hybrid wheats. IAEA-TECDOC — 455. Semi-dwarf cereal mutants and their use in cross-breeding III: 57 — 68.
- Grzesik H. 2002. Charakterystyka rodów pszenżyta ozimego odpornych na porastanie. Biul. IHAR 223/224: 145 — 150.
- Grzesik H., Gut M., Węgrzyn S., Cygankiewicz A. 2001. Związek porastania z innymi cechami heksaploidalnego pszenżyta ozimego (*X Triticosecale* Witt.). Biul. IHAR 218/219: 269 — 275.
- Grzesik H., Gut M., Węgrzyn S., Cygankiewicz A. 2003. Genetyczne uwarunkowania niektórych cech pszenżyta ozimego. Biul. IHAR 226/227: 227 — 231.
- Kączkowski J. 2002. Struktura i znaczenie jakościowe składników glutenu pszenicy — metody badawcze. Biul. IHAR 223/224: 3 — 31.
- Laemmli V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680 — 685.
- Morris R., Schmidt J. W., Jonson V. A. 1972. Chromosomal location of a dwarfing gene in "Tom Thumb" wheat derivative by monosomic analysis. Crop Sci. 12: 247 — 249.

- Moś M. 1994. Porastanie pszenżyta ozimego. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie, Rozprawy nr 195.
- Moś M. 2003. Changes in the germinability and vigour of winter triticale seeds with sprouting damage. *Plant Soil Environ.* 49, 3: 126 — 130.
- Moś M., Wójtowicz T. 2002. Variability of field emergence of winter triticale seeds with sprouting damage. *Cereal Res. Commun.* 30, 3/ 4: 391 — 396.
- Payne P. I., Holt L. M., Jackson E. A., Law C. N. 1984. Wheat storage proteins: Their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 304: 259 — 371.
- Ruebenbauer T., Brej S. 1957. Hodowla roślin zbożowych. PWRiL, Warszawa.
- Rybka K., Małuszyńska E. 2002. Is the major pre-harvest sprouting resistance locus in triticale localized on the third rye chromosome? *Proc. of 5th International Triticale Symposium, Radzików, Poland, vol. II*: 219 — 222.
- Shishlova N. P., Shishlova A. M. 2002. Influence of abiotic factors on the resistance of winter triticale to pre-harvest sprouting in the conditions of Belarus. *Proc. of 5th International Triticale Symposium, Radzików, Poland, vol. II*: 223 — 228.
- Tarkowski C. 1978. Czynniki warunkujące produktywność roślin. PWN, Warszawa.
- Varshney R. K., Prasad M., Roy J. K., Roder M. S., Balyan H. S., Gupta P. K. 2001. Integrated physical maps of 2DL, 6BS and 7DL carrying loci for grain protein content and pre-harvest sprouting tolerance in bread wheat. *Cereal Res. Commun.* 29, 1/ 2: 33 — 40.
- Wahl T. I., O'Rourke A. D. 1992. The economics of sprout damage in wheat. In: Walker-Simmons M. K., Ried J. L. (eds.). *Pre-harvest sprouting in cereals. USA*: 3 — 7.
- Weidner S. 1992. Przedsprzędne porastanie ziarniaków zbóż i jego regulacja. *Post. Nauk Rol.* 5/ 6: 89 — 104.
- Węgrzyn S., Gut M., Cygankiewicz A., Ptak B. 1991. Odporność rodów i odmian pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na porastanie. Część I. Pszenica ozima. *Biul. IHAR* 180: 121 — 129.
- Węgrzyn S., Gut M., Grzesik H., Bichoński A., Struś M. 1998. Resistance to pre-harvest sprouting and other traits of winter triticale. *Proc. of 4th International Triticale Symposium, Red Deer, Alberta, Canada, vol. 2*: 354—356.
- Zanetti S., Winzeler M., Keller M., Keller B., Messmer M. 2000. Genetic analysis of pre-harvest sprouting resistance in a wheat x spelt cross. *Crop Sci.* 40: 1406 — 1417.
- Zeleny L., Greenway W. T., Georgia M., Fifield C. C., Lelsbach K. L. 1960. Sedimentation values an index of dough mixing characteristics in early generation wheat selection. *Cereal Chem.* 37: 673 — 676.