

MIŁOSZ SMOLIK
DANUTA RZEPKA-PLEVNEŠ
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Ocena zmienności genetycznej linii wsobnych i mieszańcowości żyta metodą SDS-PAGE

Evaluation of genetic variation of inbred lines and a degree of hybridity of rye by SDS-PAGE method

Obiektem badań było 14 mieszańców F_1 otrzymanych ze skrzyżowania 13 linii pochodzących z głębokiego chowu wsobnego o różnym poziomie tolerancji na niedobory pokarmowe w podłożu w fazie siewki. Linie rodzicielskie pochodziły z kolekcji: Katedry Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Szczecinie i Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW w Warszawie, mieszańce F_1 z badań własnych. Genotypy mieszańców F_1 i ich form rodzicielskich porównywano w oparciu o analizę białek zapasowych metodą SDS-PAGE w układzie nieciągłym na dwóch rodzajach żeli poliakrylamidowych (4 i 12%) w aparacie Mini Protein II przy stałym natężeniu prądu 50 mA. Otrzymane rozdziały elektroforetyczne analizowano pod względem liczby i masy prążków w świetle przechodzącym skanera Sharp JX-330 za pomocą programu komputerowego „Diversity one 1.3”. Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, że linie wsobne mimo różnic fenotypowych (poziom tolerancji) należały do tych samych grup podobieństwa genetycznego. Analiza zmienności elektroforetycznej sekalin mieszańców F_1 otrzymanych ze skrzyżowania tych linii wykazała u większości z nich obecność markerów białkowych obu komponentów rodzicielskich. Najliczniejszą grupę stanowiły mieszańce, u których przeważały prążki mateczne (podobieństwo genetyczne 61–94%). Otrzymane wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania testu SDS-PAGE do oceny mieszańcowości F_1 żyta.

Słowa kluczowe: linie wsobne, mieszańce F_1 , SDS-PAGE, polimorfizm

The object of the studies were 14 F_1 hybrids obtained by crossing 13 inbred lines of different tolerance to nutrient deficiency in the medium at a seedling stage. Parental lines originated from the collection of: the Department of Plant Breeding of Szczecin Agricultural University and the Department of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology of Warsaw Agricultural University, and F_1 hybrids originated from our earlier studies. Genotypes of F_1 hybrids and their parental forms were compared on basis of analysis of storage proteins using SDS-PAGE test (discontinuous system) performed on two kinds of polyacrylamide gels (4 and 12.5%) in Mini Protein II apparatus at constant voltage 50 mA. The obtained electrophoretic patterns were analyzed by means of the computer programme Diversity one 1.3 to evaluate the number and weight of bands in the light of a scanner Sharp JX-330. It was found that despite phenotypic differences (tolerance level) inbred lines belonged to the same group of genetic similarity. Analysis of electrophoretic variation of secalin in F_1 hybrids obtained by crossing inbred lines showed the presence of protein markers of both parental components the great majority of hybrids. The hybrids, in which maternal bands dominated (genetic similarity 61–94%) were prevalent.

The results indicate that SDS-PAGE test may be used to evaluation of a degree of rye varieties hybridity.

Key words: inbred lines, F₁ hybrids, SDS-PAGE, polymorphism

WSTĘP

Żyto ozime *Secale cereale* L. jest jednym z najtrudniejszych obiektów hodowli (Wolski, 1985). Składa się na to jego obcopłodność, niedostateczna wciąż znajomość dziedziczenia się wielu ważnych gospodarczo cech i właściwości oraz małe zainteresowanie nim hodowców większości krajów świata.

Uzyskanie nowej odmiany tej rośliny, lepszej od odmian już istniejących jest trudne i kosztowne. Wymaga bowiem równoległego stosowania różnych materiałów wyjściowych, nowych metod, jak odmian populacyjnych, jak i mieszańcowych żyta. Te ostatnie są coraz bardziej popularne, zarówno wśród hodowców, jak i producentów tej rośliny (Kadłubiec, 2002).

Duże podobieństwo genetyczne odmian roślin uprawnych sprawia, że hodowcy odchodzą od markerów morfologicznych pomocnych przy doborze materiałów wyjściowych do hodowli zastępując je markerami białkowymi i DNA (Rom i in., 1995; Barański, 1997). Używają ich również do oceny czystości odmianowej nasion odmian mieszańcowych. W tym ostatnim przypadku wykorzystują najczęściej markery molekularne RAPD, RFLP.

Celem niniejszej pracy było określenie w oparciu o elektroforezę SDS-PAGE zróżnicowania genetycznego wsobnych linii żyta oraz jej przydatności do charakterystyki mieszańcowości F₁ żyta.

MATERIAŁ I METODY

Obiektem badań było 13 linii wsobnych żyta o różnym stopniu tolerancyjności na niedobory N i K w podłożu w fazie siewki oraz 14 mieszańców F₁ otrzymanych z ich skrzyżowania (tab. 1). Linie o numerach od 1 do 7 pochodziły z kolekcji Katedry Hodowli Roślin AR w Szczecinie, od 8 do 13 z Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW w Warszawie, a linie 39, 42 i 57 wyprowadzono z materiałów hodowlanych ZDHAR Smolice. Wszystkie użyte do badań linie żyta były potomstwem późnych pokoleń chowu wsobnego. Mieszańce F₁ otrzymano w ramach badań prowadzonych w Zakładzie Hodowli Roślin Ogrodniczych AR w Szczecinie. Genotypy linii rodzicielskich i potomstw F₁ porównywano w oparciu o elektroforetyczne rozdziały białek zapasowych przeprowadzonych w 3 powtórzeniach, techniką SDS-PAGE według metody opisanej przez Westermeiera (1997).

Białka zapasowe wymienionych genotypów żyta izolowano z 5 losowo wybranych z każdej próbki ziarniaków żyta, z każdego oddzielnie a po sprawdzeniu ich jednorodności genetycznej tworzone próbki zbiorczą składającą się z 40 µl sekalin każdego z ziarniaków. Elektroforezę prowadzono w układzie nieciągłym w dwóch rodzajach żeli

poliakrylamidowych: zagęszczającym (4%) i rozdzielającym (12%) w obecności buforu Tris-Glycine-SDS.

Tabela 1

Pochodzenie linii rodzicielskich. Kombinacje krzyżowań
Origin of parental lines. Cross combinations

Lp. No.	Linia wsobna Inbred lines	Pochodzenie Origin	Źródło pyłku Source of pollen
1.	723/81,k-12 ²	<i>S. montanum</i> × <i>S. kuprianovi</i> × <i>S. cereale</i>	Ot 0-25 ¹ ; Ot 0-20 ²
2.	143/79-9 ¹	<i>S. montanum</i> × <i>S. kuprianovi</i> × <i>S. cereale</i>	Ot 0-25 ¹
3.	153/79-1-5 ¹	<i>S. montanum</i> × <i>S. kuprianovi</i> × <i>S. cereale</i>	Ot 1-3 ³
4.	Ot 0-25 ¹	Otello	
5.	Ot 0-20 ²	Otello	
6.	Ot 1-3 ³	Otello	
7.	Ot 0-6 ¹	Otello	Ot 1-3 ³
8.	62 ²	Pancerne	39 ²
9.	39 ²	nieznane — unknown	60 ² , 48 ²
10.	48 ³	nieznane — unknown	60 ² , 42 ²
11.	60 ²	Pancerne	42 ² , 62 ²
12.	42 ²	nieznane — unknown	
13.	57 ¹	nieznane — unknown	60 ² , 42 ²

¹ — Tolerancyjna na niedobory N i K, tolerant to N and K deficit

² — Średnio tolerancyjna, mean tolerant

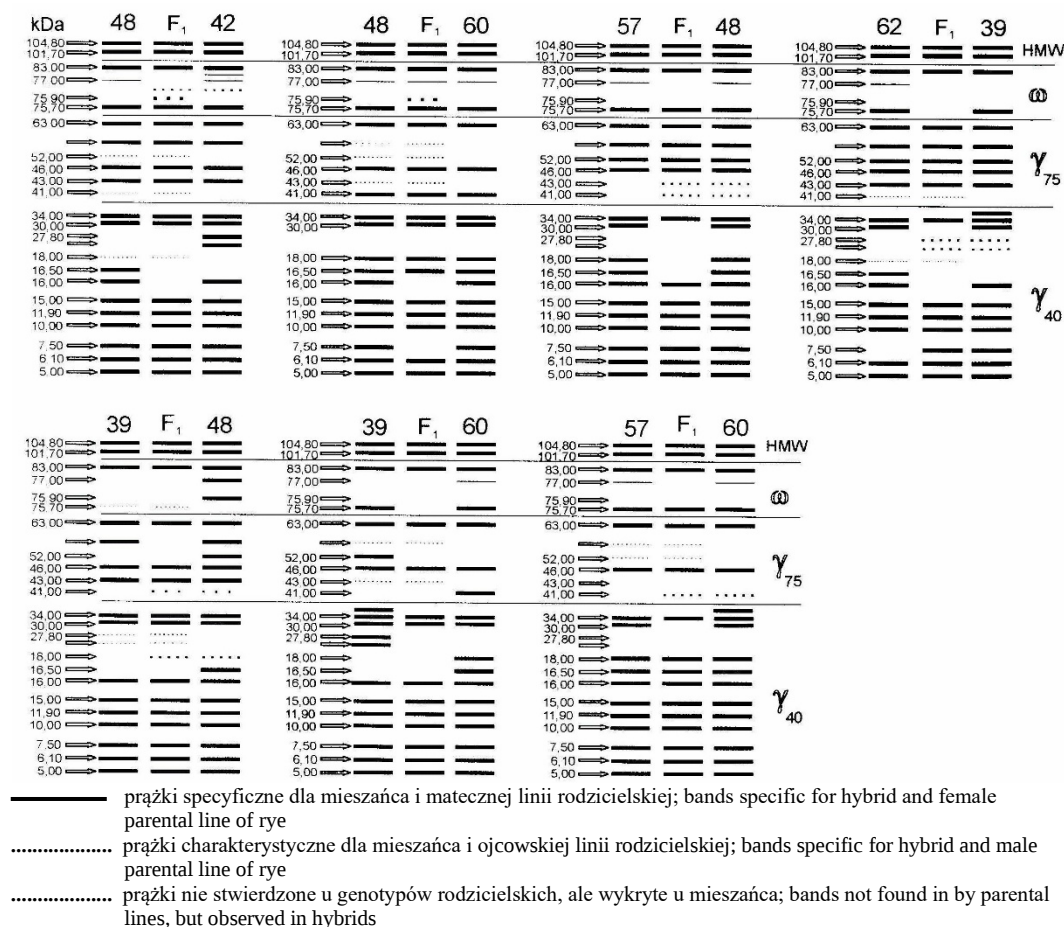
³ — Nietolerancyjna, non-tolerant

Polimeryzacji żeli dokonano w obecności 10 µl TEMED-u i 50 µl APS (nadsiarczanu amonu). Rozdział białek prowadzono przez 4 godziny na dwóch typach aparatów: Mini Protean II (Bio-Rad) i Multiphor II (Pharmacia LKB), przy stałym natężeniu prądu 50 mA. Wzorcem masowym była mieszanina rekombinowanych białek o masach od 15 do 83 kDa (Terpol). Po przeprowadzeniu rozdziałów żele barwiono roztworem Coomassie R-250, a następnie odbarwiano w roztworze 10% etanolu i 20% kwasu octowego. Następnie moczono je w roztworze gliceryny i suszono przez 3 dni w temperaturze pokojowej. Wysuszone żele analizowano w świetle przechodzącym przy użyciu skanera Sharp JX-330 (Pharmacia LKB), a otrzymane cyfrowe obrazy opracowywano w oparciu o pakiet programu komputerowego „Diversity one 1.3”. Ustalono liczbę i masę wyodrębnionych na żelu prążków białkowych, prążki białkowe pogrupowano w zależności od ich masy (długości polipeptydu) do odpowiednich frakcji białkowych, określono podobieństwo genetyczne linii wsobnych żyta oraz ustalono obecność prążków białkowych liniowych komponentów rodzicielskich w obrazach ich mieszańców.

WYNIKI

Wybrane do krzyżowań linie wsobne żyta charakteryzowały się małą zmiennością pod względem liczby wyodrębnionych na elektroforegramach polipeptydów (rys. 1, 2). Ich liczba wahała się od 19 do 22 polipeptydów ogółem. Największym polimorfizm obserwowano we frakcjach γ_{40} i γ_{75} , przy czym nie dotyczył on raczej liczby, ale masy widocznych na elektroforegramach polipeptydów (rys. 1, 2). Wszystkie linie różniły specyficzny wzór prążkowy pozwalający zidentyfikować każdą z badanych linii. U większości z nich

występował we frakcji γ_{40} prążek o masie 43 kDa. Nie był on jednak związany z tolerancyjnością na niedobory N i K w podłożu (Rzepka-Plevneš, Smolik, 2001).

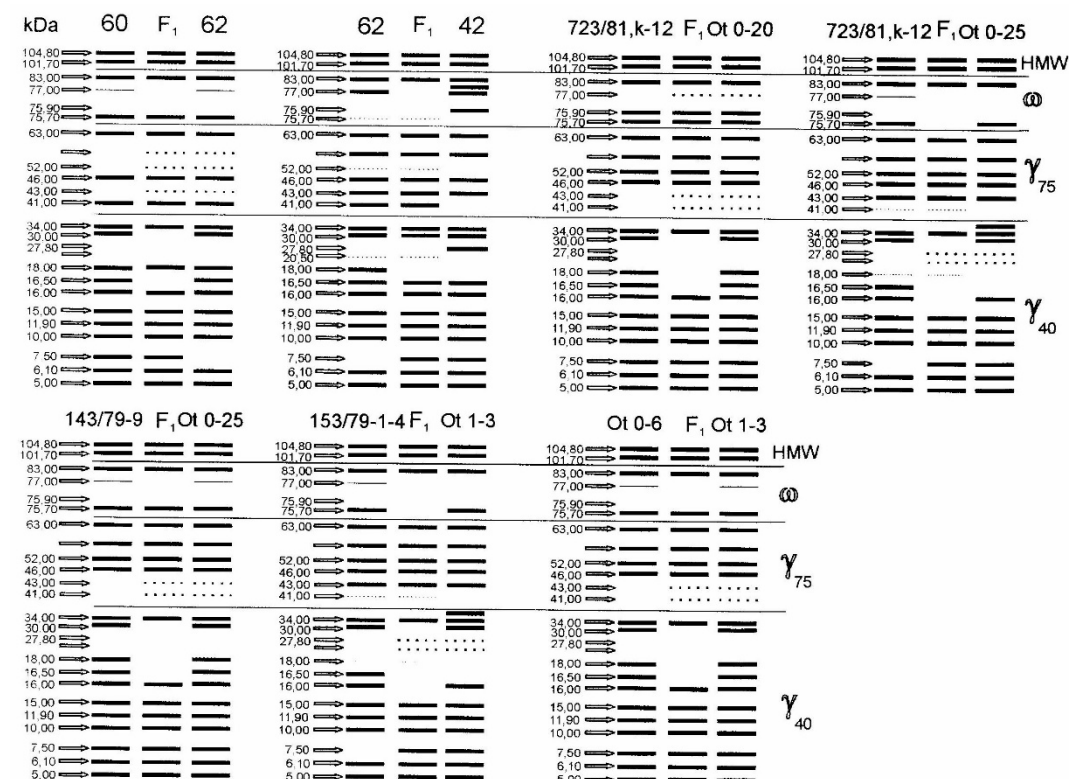


Rys. 1. Obrazy elektroforetyczne sekalin linii rodzicielskich żyta i ich mieszańców F₁ z zaznaczeniem specyficznych dla testowanych genotypów układów prążków białkowych
Fig. 1. Electrophoretic patterns for secalins in parental lines and F₁ hybrids of rye with specific protein bands for tested genotypes

Analiza dendrogramu skonstruowanego w oparciu o indeksy podobieństwa pozwoliła pogrupować badane linie w zależności od ich pochodzenia. Na ogół linie o podobnym rodowodzie były łączone w obrębie tej samej grupy. Podobieństwo między liniami wahało się od 74 do 95%. W grupie linii pochodzących z kolekcji AR w Szczecinie wynosiło 74,4 do 88%, kolekcji SGGW w Warszawie od 80,1 do 95%.

Otrzymane w wyniku krzyżowań linii wsobnych mieszańce F₁ charakteryzowała obecność prążków białkowych obu komponentów rodzicielskich (rys. 1, 2, 3). U większości z nich obserwowano jednak większe podobieństwo do linii matczynej, niż

ojcowskiej. Wśród otrzymanych mieszańców F_1 były również takie, u których w obrazach elektroforetycznych identyfikowano obecność większej liczby polipeptydów ojcowskich.



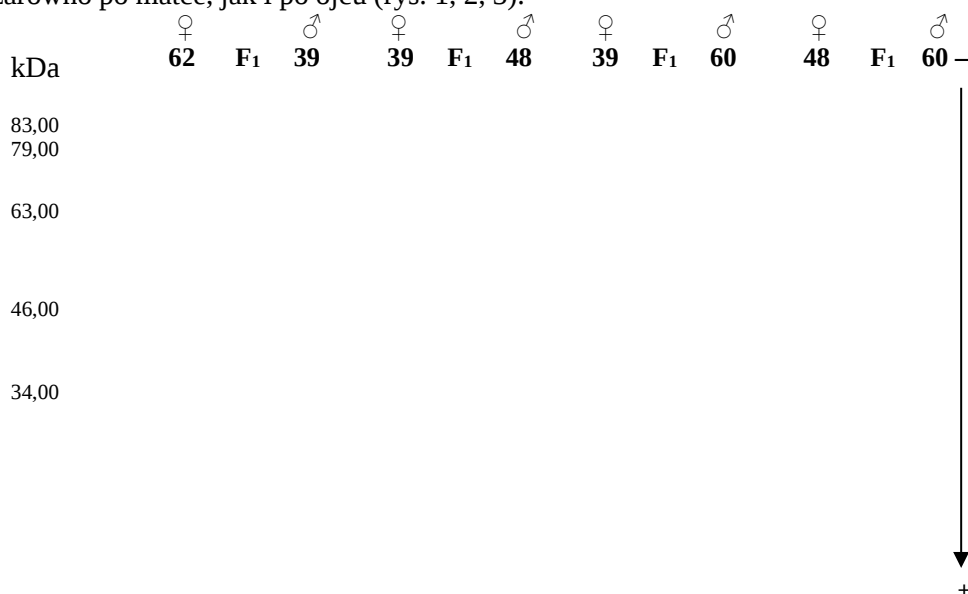
- prążki specyficzne dla mieszańca i matczynej linii rodzicielskiej; bands specific for hybrid and female parental line of rye
 prążki charakterystyczne dla mieszańca i ojcowskiej linii rodzicielskiej; bands specific for hybrid and male parental line of rye
 prążki nie stwierdzone u genotypów rodzicielskich, ale wykryte u mieszańca; bands not found in by parental lines, but observed in hybrids

Rys. 2. Obrazy elektroforetyczne sekalin linii rodzicielskich żyta i ich mieszańców F_1 z zaznaczeniem specyficznych dla testowanych genotypów układów prążków białkowych
Fig. 2. Electrophoretic patterns for secalins in parental lines and F_1 hybrids of rye with specific protein bands for tested genotypes

Na podstawie otrzymanych wyników u wszystkich mieszańców F_1 stwierdzono występowanie w obrębie sekalin wysokocząsteczkowych HMW rodzicielskich polipeptydów o masach 101,7 i 104,8 kDa. Polimorficzną frakcją białek okazała się u nich frakcja ω . Obserwowane w niej różnice, dotyczyły obecności lub braku prążków białkowych, typowych dla linii rodzicielskich. Były to następujące liniowe mieszańce F_1 : 48×42 , 48×60 , 39×48 , 62×42 , $723/81, k-12 \times Ot\ 0-20$, $723/81,k-12 \times Ot\ 0-25$ oraz $Ot\ 0-6 \times Ot\ 1-3$. Dla mieszańców tych polimorficznymi okazały się białka frakcji ω o masach: 75,7, 75,9, 77 kDa. Brak polipeptydów rodzicielskich obserwowano u mieszańców F_1 : 57×48 , $62 \times$

39, 39×60 , 57×60 , 60×62 , 723/81, k-12 $\times$ Ot O-25 i 153/79-1-4 $\times$ Ot 1-3. Kolejną z wyodrębnionych na elektroforegramach mieszańców F_1 frakcję sekalin γ_{75} charakteryzował podobny do frakcji ω polimorfizm oraz obecność wszystkich prążków rodzicielskich (rys. 1, 2). Różnice między nimi polegały na tym, że mieszańce F_1 : 57×48 , 39×48 , 60×62 , 723/81, k-12 $\times$ Ot O-20, 723/81, k-12 $\times$ Ot 0-25 miały w omawianej frakcji sekalin prążki ojcowskie, pozostałe zaś z badanych mieszańców — prążki mateczne.

Podobnie polimorficzną u badanych mieszańców F_1 , okazała się frakcja białek najlżejszych — γ_{40} . Polipeptydy tej frakcji występowały na elektroforegramach w różnych układach pozwalających określić ich pochodzenie. Przy czym u jednych mieszańców F_1 obserwowano w tej frakcji zwiększoną liczbę prążków matecznych (48×42 , 62×39 , 62×42 , 723/81, k-12 $\times$ Ot O-20, 723/81, k-12 $\times$ Ot 0-25, 143/79-9 $\times$ Ot 0-25, 153/79-1-4 $\times$ Ot 1-3 i Ot 0-6 $\times$ Ot 1-3), a u innych (57×48 , 60×62 , 723/81, k-12 $\times$ Ot O-20) przeważały prążki ojcowskie. Relacje podobieństw genetycznych między mieszańcami F_1 w tej frakcji polegały na tym, że polipeptydy występowały w nich w różnych układach, dziedziczonych zarówno po matce, jak i po ojcu (rys. 1, 2, 3).



Rys. 3. Elektroforetyczny obraz sekalin wybranych linii wsobnych żyta i ich mieszańców F_1 z zaznaczeniem niektórych polipeptydów specyficznych dla mieszańca i danej linii rodzicielskiej
Fig. 3. Electrophoretic patterns for secalins in some inbred lines of rye and their F_1 hybrids with polypeptides specific for both a hybrid and a parental line

Analiza drzewa podobieństwa filogenetycznego mieszańców F_1 , uwzględniała ich podobieństwo do linii rodzicielskich. I tak mieszańce F_1 : 39×48 , 57×60 , 60×42 , 723/81, k-12 $\times$ Ot O-25, Ot 0-6 $\times$ Ot 1-3, 48×60 , 153/79-1-4 $\times$ Ot 1-3 wykazywały bardzo bliskie podobieństwo do form matecznych odpowiednio: 94,1%, 75%, 61,5%, 73,2%,

89,7%, 90% i 91,9%, a do linii ojcowskich mieszańce: 62×39 (76,9%), 60×62 (63,9%), $723/81,k-12 \times Ot O-20$ (79,1%). U pozostałych mieszańców obserwowano odmienne od wyżej przedstawionych relacje podobieństw i polegały one na tym, że linie rodzicielskie były do siebie bardziej zbliżone genetycznie, niż do mieszańców F_1 (rys. 1, 2, 3).

DYSKUSJA

Rozwój technik biologii molekularnej sprawił, że coraz więcej hodowców poszukuje tanich i szybkich metod oceny jednorodności mieszańców F_1 . Można w tym celu wykorzystać zarówno markery białkowe, jak i markery DNA (Dubreuil i in., 1999; Atienza i in., 2000). Obie te metody pozwalają porównać zarówno genotypy rodzicielskie, jak i otrzymane w wyniku ich krzyżowania mieszańce F_1 (Welsh i in., 1995). Podstawowym warunkiem wykorzystania wymienionych metod jest znalezienie markerów, pozwalających różnicować badane populacje rodzicielskie między sobą oraz jednorodność form rodzicielskich użytych do krzyżowań (Waga, 1991).

Badania Orellana i wsp. (1993) oraz Niedzielskiego i wsp. (1997) dowiodły, że elektroforetyczna analiza białek zapasowych, podobnie jak i DNA, jest metodą przydatną do oceny czystości mieszańców F_1 . Pierwszy z nich badał polimorfizm białek zapasowych dwóch linii wsobnych żyta 8t i 6Ri, drugi — serii linii S1/96. Obaj wykazali, że linie wsobne różnią się między sobą genotypowo, a przejawia się to obecnością lub brakiem polipeptydów w danej frakcji sekalin i jest prawdopodobnie wynikiem różnej ekspresji genów kodujących białko danej frakcji. Podobieństwo genetyczne badanych przez Niedzielskiego i wsp. (1997) linii wsobnych serii S1/96 mieściło się w granicach 60–90%, a największe zróżnicowanie obserwowano w przypadku sublinii wyprowadzonych z tej samej populacji żyta. Podobne do wyżej opisanych wyniki badań nad słonecznikiem otrzymali Varier i wsp. (1992), a nad kukurydzą — Drzewiecki i wsp. (1997).

Wyniki niniejszych badań są zgodne z wynikami zawartymi w cytowanych pracach. Wybrane do krzyżowań linie różniły się między sobą liczbą prążków białkowych, przy czym na ogół zależało to od ich pochodzenia. Ponadto różniły się one masą wyodrębnionych prążków białkowych. Największy polimorfizm pod względem ich liczby i masy prążków dotyczył frakcji ω , γ_{75} , γ_{40} . Również określone na podstawie analizy drzewa podobieństwa filogenetycznego podobieństwo genetyczne badanych linii zależało od pochodzenia danej linii wsobnej. Wyjątek stanowiły linie: 39 i 42, z kolekcji SGGW w Warszawie.

Według Shewry'ego i wsp. (1984), Sozinova (1987), Drzewieckiego (1997) kodominacyjny charakter dziedziczenia białek zapasowych umożliwia obserwowanie w obrazach elektroforetycznych mieszańców F_1 polipeptydów charakterystycznych dla obu komponentów rodzicielskich. Stąd o poprawności przeprowadzonych krzyżowań w przypadku białek zbóż świadczyć może obecność obok prążków matecznych także występowanie prążków charakterystycznych dla formy ojcowskiej.

Wyniki badań własnych potwierdziły kodominacyjny charakter dziedziczenia się białek zapasowych u żyta. W obrazach elektroforetycznych 14 mieszańców F_1 obserwowano markery białkowe obu komponentów rodzicielskich, przy czym u większości z nich

przeważały prąжки maceczne. Część jednak mieszańców F_1 wykazała większe genotypowe podobieństwo linii ojcowskich. Były wśród mieszańców F_1 także takie, u których na elektroforegramie nie obserwowano polipeptydów rodzicielskich. Dotyczyło to mieszańców, które otrzymano w wyniku skrzyżowania linii wykazujących bardzo bliskie podobieństwo genetyczne. Tego typu zjawisko u mieszańców F_1 Payne i wsp. (1982) tłumaczą dużą częstotliwością zmian mutacyjnych w białkach prowadzących do powstania tzw. null alleli. Ich efektem może być zablokowanie ekspresji genu kodującego poszczególne składniki białek zapasowych.

WNIOSKI

1. Polimorfizm białek zapasowych badanych linii wsobnych dotyczy przede wszystkim masy cząsteczkowej wyodrębnionych polipeptydów. Wahała się ona od 5,0 do 104,5 kDa. Dla każdej z badanych linii można było ustalić specyficzny dla niej wzór prążków białkowych.
2. Zgodnie z oczekiwaniem u większości mieszańców F_1 dziedziczenie białek zapasowych żyta ma charakter kodominacyjny, wyrażający się obecnością prążków obu rodziców użytych do krzyżowania. Przy czym u większości z nich przeważały prąжки maceczne. Podobieństwo genetyczne między liniami rodzicielskimi a mieszańcami F_1 mieściło się w granicach od 61,5 do 94,1% i było na ogół skorelowane z ich pochodzeniem.
3. Elektroforeza białek zapasowych żyta PAGE w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS) stanowi przydatne narzędzie identyfikacji linii wsobnych żyta i ich mieszańców F_1 .

LITERATURA

- Atienza S. G., Gienémez M. J., Martin A., Martin L. M. 2000. Variability in monomeric prolamins in *Hordeum chilense*. Theor. Appl. Genet. 101: 970 — 976.
- Barański R. 1997. Ocena wyrównania genetycznego nasion mieszańcowych przy wykorzystaniu analizy izoenzymatycznej. Hod. Rośl. Nasien. 4: 1 — 3.
- Drzewiecki J., Bednarek P., Warzecha R., Kurczyk Z. 1997. Propozycja oceny podobieństwa linii wsobnych kukurydzy na podstawie obrazów elektroforetycznych zein. Biul. IHAR 200: 225 — 231.
- Dubreuil P., Charcosset A. 1999. Relationships among maize inbred and populations from European and North American origins as estimated using RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 99: 476 — 480.
- Kadłubiec W. 2002. Studia nad genetyczną zmiennością i zdolnością kombinacyjną mieszańcowych i populacyjnych odmian żyta. Pr. hab. AR Wrocław 4 — 11.
- Niedzielski M., Bednarek P., Puchalski J. 1997. Różnicowanie materiałów hodowlanych żyta techniką elektroforezy białek zapasowych ziarniaków. W: Mat. I Krajowej Konf. pt. "Hodowla roślin" Poznań, 19–20 listopada. 1997: 449 — 452.
- Orellana B., Fernandez-Calvin B., Vazquez J. K., Carillo J. M. 1993. Mapping of genes controlling seed storage-proteins and cytological markers on chromosome 1R of rye. Theor. Appl. Genet. 85: 639 — 643.
- Payne P. I., Holt M. L., Lawrence G. L., Law C. N. 1982. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm. Qual. Plant Foods Nutr. 31: 229 — 241.
- Rom M., Bar M., Rom A., Pilowsky M., Gidoni D. 1995. Purity control of F_1 -hybrid tomato cultivars by RAPD markers. Plant Breeding 114: 188 — 190.

- Rzepka-Plevneš D., Smolik M. 2001. Polymorphism of the storage proteins in rye cultivars and population selected for tolerance to nutrient deficiency. Proceedings of the EUCARPIA Rye Meeting, July 4-7, 2001, Radzików, 197 — 209.
- Shewry P. R., Bradberry D., Franklin J., White R. P. 1984. The chromosomal locations and linkage relationships of the structural genes for the prolamin storage proteins (secalins) of rye. Theor. Appl. Genet. 69: 63 — 69.
- Sozinov A. A. 1987. Blocks of cereal storage proteins as genetic markers. Vavilov Institute of Cereal Genetics, USSR Academy of Science, Moscow.
- Varier A., Dadlani M., Cooke R.J. 1992. Identification of sunflower protein (*Helianthus annuus* L.) hybrids and inbreds by SDS-PAGE of seed proteins. Seed Research 20: 138 — 141.
- Welsh W., Bushuk W., Roca W., Singh S.P. 1995. Characterization of agronomic traits and markers of recombinant inbred lines from intra and interracial populations of *Phaseolus vulgaris* L. Theor. Appl. Genet. 91: 169 — 177.
- Westermeier R. 1997. Electrophoresis in practice. Second Edition. VCH Verlagsgesellschaft mBH.
- Wolski T. 1985. Breeding of open pollinated varieties. Proc. Eucarpia Meet. on Rye, 12-13.06.1985, Svalöv, Sweden: 135 — 170.