

EWA MAKARSKA

Katedra Chemii

Akademia Rolnicza w Lublinie

Określenie indeksu odmienności odmian pszenżyta ozimego metodą porównywania diagramów elektroforetycznych gliadyn

Determination of diversity index for winter triticale cultivars based on comparison of gliadin electrophoretic diagrams

Oceniono różnice odmianowe pszenżyta ozimego (Dagro, Bolero, Ugo, Malno, Tewo, ród CZR103/85) metodą porównywania diagramów elektroforetycznych gliadyn. Udział procentowy poszczególnych podjednostek gliadyn posłużył do wyznaczenia schematu diagramu badanych odmian pszenżyta. W oparciu o polimorfizm białek gliadynowych określono względne indeksy odmienności dla par odmian. Wartości tego indeksu zawierały się w granicach od 20 do 70%. Znajomość takich wskaźników można wykorzystać do oceny stopnia zróżnicowania genetycznego między odmianami i sprawdzenia efektywności krzyżowania.

Słowa kluczowe: elektroforeza gliadyn, indeks odmienności odmian, pszenżyto ozime

Differences between cultivars were evaluated in winter triticale (Dagro, Bolero, Ugo, Malno, Tewo, strain CZR 103/85) by comparing electrophoretic diagrams of gliadins. Percentage shares of particular gliadin subunits were used to prepare a scheme of diagrams for the studied triticale cultivars. On the basis of this scheme the relative diversity index was calculated for each pair of the compared cultivars. The values ranged from 20% to 70%. The indices may be useful in evaluation of degree of genetic differentiation between cultivars and for testing the effectiveness of planned crosses.

Key words: diversity index of cultivars, gliadin electrophoresis, winter triticale

WSTĘP

Heterogeniczność białek zapasowych ziarna ujawniona metodami elektroforezy jest często wykorzystywana w chemotaksonomicznych badaniach zbóż (Bushuk i in., 1978; Wirgley i in., 1982). Uwarunkowany genetycznie polimorfizm gliadyn i glutenin wykorzystywany jest obok badań sposobu dziedziczenia białka, czy funkcjonowania określonych genów do identyfikacji odmiany lub oceny tożsamości, czy odrębności nowych rodów (Galili i in., 1983; Makarska i in., 1994). Cechy te są badane w hodowli i nasiennictwie pszenicy i w hodowli pszenżyta, zwłaszcza wobec istniejących problemów

z niewystarczającą powtarzalnością cech odmianowych, czy dużą zmiennością składu chemicznego rodów i odmian (Virdi i in., 1984; Sowa i in., 1999).

Celem pracy było określenie zróżnicowania pomiędzy odmianami pszenżyta na podstawie polimorfizmu frakcji gliadyn, w oparciu o ilościową charakterystykę poszczególnych podjednostek tych białek.

MATERIAŁ I METODY

Rozdział frakcji gliadyn ziarniaków pszenżyta odmian Dagro, Bolero, Malno, Ugo, Tewo i rodu CZR 103/85 przeprowadzono według Bushuka i wsp. (1978) stosując 7% żel poliakrylamidowy w buforze mleczan glinu — kwas mlekowy przy pH=3,1 (APAGE) (rys. 1). Celem standaryzacji elektroforegramu zastosowano kanadyjską odmianę pszenicy Marquis. (rys. 2). Udziały procentowe poszczególnych podjednostek określono przy pomocy densytometru firmy Vitatron model TLD-100 z integratorem UR-402, według własnej modyfikacji, wykorzystując w tym celu powiększone pozytywy żeli na kliszy rentgenowskiej (Makarski, Makarska, 1997). Średnią ilość białka zawartego w poszczególnych pasmach określono przy pomocy analizy densytometrycznej kilku elektroforegramów otrzymanych dla każdej odmiany. Rysunek 3 przedstawia profil densytogramu zeskanowanego żelu A-PAGE odmiany Ugo. Wartości średnie procentowych udziałów rozdzielonych podjednostek gliadyn obliczone dla poszczególnych odmian (przedstawione dla przykładu dla odmiany Ugo) (tab. 1) posłużyły do wyznaczenia schematu diagramów elektroforetycznych pszenżyta ozimego (tab. 2). Uwzględniono pięć klas stężenia. Przyjęto następujący schemat: 0 — nieobecność; 1 — 0–1,5%; 2 — 1,5–4%; 3 — 4,0–6,5%; 4 > 6,5% udziału podjednostki w całkowitej absorpcji diagramu. Porównując diagramy dwóch odmian przyjęto, że istotna różnica w koncentracji wspólnej podjednostki (o tym samym Rf) jest wtedy, gdy różni się co najmniej o dwie klasy stężenia: np. 0 i 2 (różnica ilościowa i jakościowa), 1 i 3 lub 1 i 4 (znaczące różnice ilościowe). Przyjęty schemat jest modyfikacją metody Autrana i wsp. (1975) zastosowanej do 73 odmian pszenicy.

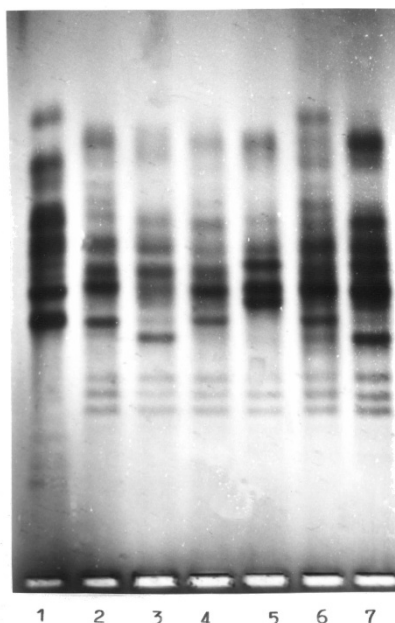
Znając liczbę podjednostek oraz ich względną ruchliwość można na podstawie diagramu przedstawić w sposób ilościowy indywidualność odmianową wyliczając, tzw. indeks odmienności dla dwóch porównywanych odmian. W tym celu jako jeden przyjęto punkt indeksu % udziału wspólnej podjednostki (prążka) dla obu odmian, gdy jest on istotnie zróżnicowany (według przyjętej reguły pięciu klas stężeń) lub 0 punktów, jeśli różnica nie była istotna. Bezwzględny indeks odmienności (BIO), więc jest sumą punktów przypisanych dla każdej podjednostki dwóch porównywanych diagramów. Względny indeks odmienności (WIO) obliczono jako stosunek wartości bezwzględnego indeksu do całkowitej liczby podjednostek gliadynowych odmian razy 100.

$$WIO = BIO \times 100/N$$

N — liczba wszystkich podjednostek gliadyn występujących w dwóch porównywanych odmianach.

WYNIKI I DYSKUSJA

Rysunki 1 i 2 przedstawiają elektroforegramy gliadyn pszenżyta ozimego oraz pszenicy Marquis zastosowanej jako wzorzec.

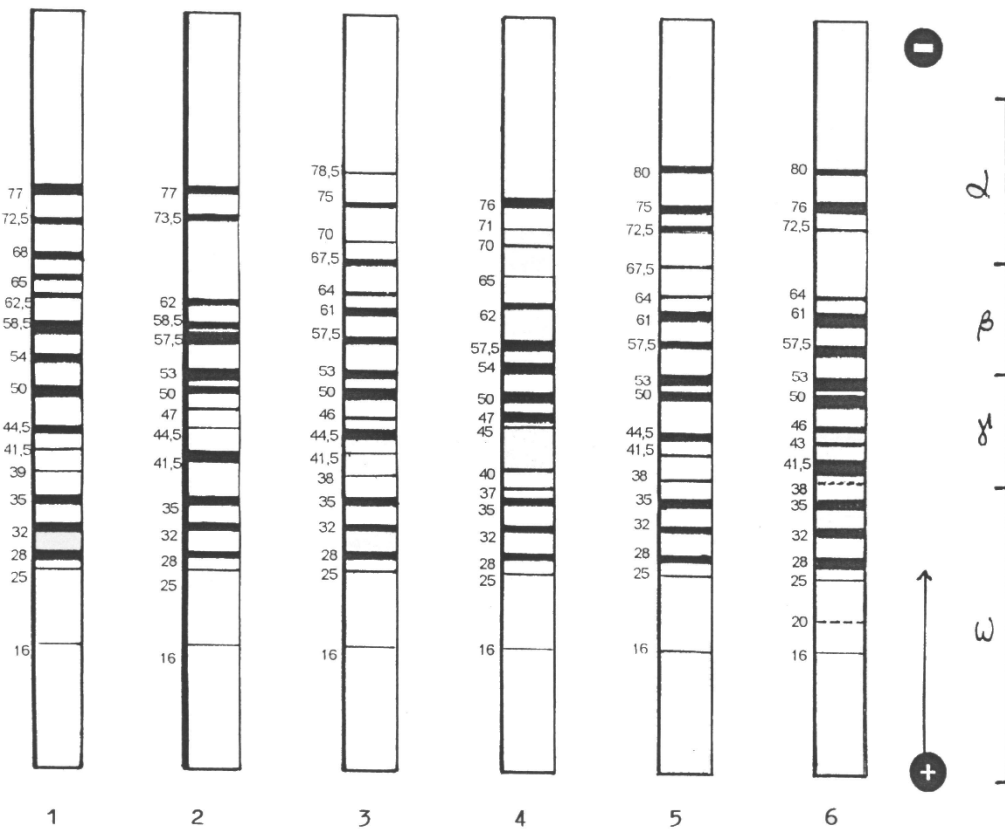


Rys. 1. Elektroforegram (A-PAGE) gliadyn pszenżyta ozimego: 1 — Marquis – wzorzec, 2 — Dagro, 3 — Bolero, 4 — Ugo, 5 — Malno, 6 — Tewo, 7 — CZR 103/85

Fig. 1. Electrophoregramm (A-PAGE) of gliadins of winter triticale cultivars: 1 — Marquis — standard, 2 — Dagro, 3 — Bolero, 4 — Ugo, 5 — Malno, 6 — Tewo, 7 — CZR 103/85

Wartości R_f dla 37 podjednostek gliadyn rozdzielonych w odmianach mieszczą się w zakresie od 16 do 80 (rys. 2). Ocena diagramów uwypatnia zarówno różnorodność odmianową tych białek zapasowych, jak i ich podobieństwo oparte na wspólnych podjednostkach. Elektroforeza (A-PAGE) gliadyn (wg Bushuka i Zillmana, 1978) preferuje dobry rozdział białek wolniej migrujących w żelu, o wyższej masie cząsteczkowej tzw. ω -gliadyn, w strefie, których wyodrębniono 6–7 podjednostek obecnych w każdej odmianie, ale zróżnicowanych ilościowo (rys. 1). W tabeli 1 zestawiono wartości współczynnika ruchliwości (R_f) poszczególnych podjednostek gliadyn odmiany Ugo oraz ich udział procentowy jako średnią z 6 diagramów obliczoną na podstawie odczytu z densytometru, odchylenie standardowe (S) i współczynnik zmienności (V%) przy $n = 6$. Analizując dane w tabeli 1 można zauważyć, że rozproszenie wyników (S), wynikające raczej z fluktuacji doświadczalnych, jest zawsze mniejsze niż różnice koncentracji podjednostek przyjęte jako istotne (tab. 2). Wydaje się, że taki margines bezpieczeństwa dla przyjętego schematu 5 klas stężeń jest wystarczający, jeśli weźmiemy pod uwagę, że podobne zależności uzyskano dla

pozostałych odmian. Można przyjąć, że różnice między dwoma diagramami są istotne, jeśli odchylenie koncentracji podjednostki o tej samej ruchliwości (R_f) jest co najmniej o dwie klasy stężeń. Przyjęta metoda jest oparta na badaniach Autrana i wsp. (1975) dotyczących identyfikacji odmian pszenic na bazie różnorodności gliadyn rozdzielonych elektroforetycznie. Potwierdzeniem wniosków tych autorów były także badania genetycznej zmienności stężeń podjednostek gliadyn przeprowadzone przez Branlarda (1983) na 2 pokoleniach (F_1 i F_2) 4 genotypów pszenicy.



Rys. 2. Elektroforegram gliadyn pszenżyta ozimego: 1 — Dagro, 2 — Bolero, 3 — Ugo, 4 — Malno, 5 — Tewo, 6 — CZR 103/85

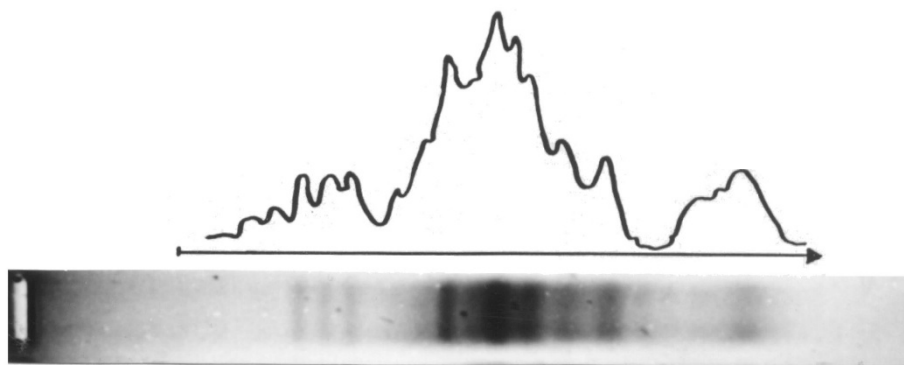
Fig. 2. Electrophoregram of gliadins of winter triticale cultivars: 1 — Dagro, 2 — Bolero, 3 — Ugo, 4 — Malno, 5 — Tewo, 6 — CZR 103/85

Tabela 1

Względna zawartość frakcji gliadyn odmiany Ugo jako % udziału podjednostki w całkowitej absorpcji diagramu (n = 6)

Relative contents of the gliadin fractions in the cultivar Ugo as percentage shares of the subunits in complete absorption of the diagram (n = 6)

Względna ruchliwość podjednostek (R_f) Relative mobility of subunits	Zakres minimum — maksimum Minimum — Maximum range	$\bar{X}$ Średnia Mean	S Odchylenie standardowe Standard deviation	V % Współczynnik zmienności Coefficient of variation (%)
16	0,81 — 1,25	1,03	0,28	27,18
25	0,75 — 1,30	1,02	0,34	33,33
28	5,30 — 7,10	6,15	0,55	8,94
32	4,25 — 5,90	5,07	0,60	11,83
38	1,9 — 3,24	2,72	0,48	17,65
41,5	2,05 — 3,62	2,90	0,36	12,41
44,5	12,64 — 16,55	14,53	1,25	8,60
46	4,92 — 5,70	5,33	0,40	7,50
50	17,10 — 18,35	17,70	0,61	3,45
53	8,65 — 10,12	9,44	1,13	11,97
57,5	4,90 — 5,45	5,18	0,43	8,30
61	5,15 — 6,03	5,60	0,32	5,71
64	1,85 — 2,36	2,08	0,16	7,69
67,5	2,10 — 2,80	2,54	0,39	9,90
70	1,90 — 3,12	2,64	0,19	7,19
75	10,22 — 12,45	11,38	0,86	7,56
78,5	0,67 — 0,84	0,77	0,12	15,58



Rys. 3. Profil densytometryczny zeskanowanego żelu (A-PAGE) gliadyn odmiany Ugo
Fig. 3. Densitometric profile of the scanned gel (APAGE) with gliadins for the cultivar Ugo

Schemat przedstawiony na podstawie diagramów elektroforetycznych (tab. 2.) umożliwia szybkie oszacowanie stopnia zróżnicowania lub podobieństwa między odmianami. Porównanie dwóch kolumn tabeli 2 (2 odmiany) pozwala na stwierdzenie znaczącej lub nieznaczącej (wg przyjętej reguły) odmienności między odmianami.

Tabela 2

Schemat diagramów elektroforetycznych badanych odmian pszenżyta ozimego
Scheme of electrophoretic diagrams of the studied winter triticale cultivars

Względna ruchliwość podjednostek (R_f) Relative mobility of subunits	Dagro	Bolero	Ugo	Malno	Tewo	CZR 103/85
16	1	1	1	2	1	1
20						1
25	1	1	1	1	1	1
28	3	3	3	3	3	3
32	3	3	3	2	3	3
35	3	3	2	2	3	2
37				1		
38			2		2	1
39	2					
40				2		
41,5	2	4	2		3	4
43						3
44,5	4	2	4		4	
45				2		
46			3			
47		3		4		
50	4	4	4	4	4	4
53		4	4		4	4
54	4			4		
57,5		4	3	4	4	4
58,5	4	2				
61			3		3	4
62		3		4		
62,5	3					
64			2		3	
65	2			2		
67,5			2		2	2
68	2					
69						
70			2	2		
71				2		
72,5	3				3	2
73						
73,5		4				
75			4		3	
76				4		4
77	4	3				
78,5			1			
80					3	4

Udział podjednostki w całkowitej absorpcji diagramu

Of the subunit share in complete absorption of the diagram

1 0–1,5%

2 1,5–4,0%

3 4,0–6,5%

4 > 6,5%

0 nieobecność — absence

W tabeli 3 przedstawiono obliczone na podstawie wcześniej omówionej metody względne indeksy odmienności dla analizowanych odmian pszenżyta ozimego. Wartość indeksu praktycznie może mieścić się w zakresie 0–100%, wskazując udział komponentów

odpowiedzialnych za istotne różnice w stosunku do wszystkich podjednostek pary diagramów branych pod uwagę. Prezentowane w tabeli 3 indeksy odmienności 6 odmian pszenżyta ozimego mieszczą się w granicach od 20–70%. Wysokie wartości indeksu np. 70% dla Tewo i Malno wskazują na duży polimorfizm gliadyn w tych odmianach i rozpoznawalność ich jest jednoznaczna. Mniejsze zróżnicowanie obserwowano dla odmian Tewo i Ugo, gdzie indeks wynosi 20% czy rodu CZR 103/85 i Tewo — indeks 28%. Warto zauważyć, że wartość indeksu odmiany Ugo i rodu CZR 103/85 wynosi 39%, a formy te mają wspólny komponent-pszenżyto CT 93/76. Porównanie indeksów analizowanych odmian wskazuje na istnienie wystarczającej ilości znaczących różnic dla rozpoznania każdej odmiany przyjętą metodą. Według Autrana i wsp. odmiany pszenic prezentujące bliskie pokrewieństwo, posiadały dość podobne diagramy gliadyn i rozpoznawalność ich tą metodą była utrudniona. Odmiany te miały indeksy w granicach 4–9%, np. Joss-Hardi — 4%, czy Champlein-Hardi — 9%. To większe lub mniejsze podobieństwo diagramów wynika z relacji istniejącej między konstytucją (składem, budową) gliadyn rozdzielonych elektroforetycznie a pochodzeniem genetycznym zbóż (Branlard, 1983; Galili i Feldman, 1983; Virdi i Later, 1984).

Tabela 3

Względne indeksy odmienności między elektroforegramami gliadyn odmian pszenżyta ozimego
Relative diversity indices between gliadin electrophoregrams of winter triticale cultivars

Odmiany/rody Cultivars/strains	Dagro	Bolero	Ugo	Malno	Tewo	CZR 103/85
Dagro	0	66	65	64	62	65
Bolero		0	61	56	54	50
Ugo			0	63	20	39
Malno				0	70	59
Tewo					0	28
CZR 103/85						0

Heterogeniczność gliadyn może, więc być brana pod uwagę jako rodzaj markeru genetycznego, a indeksy odmienności między diagramami odmian wydają się konstituować pośredni sposób wyrażania pokrewieństwa genetycznego. Dla hodowców i genetyków znajomość takich wskaźników informujących o stopniu pokrewieństwa między porównywanymi taksonami można wykorzystać do sprawdzenia efektywności krzyżowania, identyfikacji odmian czy selekcji form o optymalnym składzie gliadyn.

WNIOSKI

1. Wykorzystując polimorfizm gliadyn pszenżyta, rozdzielonych elektroforetycznie, można określić stopień zróżnicowania genetycznego odmian obliczając indeksy odmienności między diagramami.
2. Zastosowana metoda elektroforezy gliadyn pszenżyta (APAGE), wykorzystywana do identyfikacji odmian charakteryzuje się:
 - wysoką specyficznością głównie w obszarze ω -gliadyn,

— szybkością i łatwością uzyskania wyników oraz wymaga niewielkiej ilości materiału do badań.

LITERATURA

- Autran J.C., Bourdet A. 1975. L'identification des variétés de blé: Etablissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique gliadines du grain. Ann. Amélior. Plant 25: 277 — 311.
- Branlard G. 1983. Study of genetic determination of 20 gliadin bands. Theor. Appl. Genet. 64: 155 — 162.
- Bushuk W., Zillman R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. Can. J. Plant Sci. 58: 505 — 515.
- Galili G., Feldman M. 1983. Genetic control of endosperm protein in wheat. 2. Variation in high molecular weight glutenin and gliadin subunits of *Triticum aestivum*. Theor. Appl. Genet. 66: 77 — 86.
- Makarska E., Gruszecka D., Tarkowski Cz. 1994. The effect of chromosome 1B_L/1R_S on the composition of wheat prolamin fraction. Bull. Pol. Academy Sci. 42 (2): 159 — 161.
- Makarski B., Makarska E. 1997. The use of positive photographic for densitometry of gliadins from cereals by PAGE. Pol. J. Food Nutr. Sci. 6/47: 85 — 89.
- Sowa W., Krysiak H., Pěna R. J., Cygankiewicz A. 1999. Charakterystyka nowego źródła cech jakościowych ziarna pszenżyta (RAH-116). Biul. IHAR. 211: 165 — 170.
- Virdi B. V., Later E. N. 1984. The influence of wheat-rye parental species on the protein characteristics of primary triticales. Can. J. Genet. Cytol. 26/3: 258—263.