

JERZY ZIENTARSKI**JACEK WAGA**

Zakład Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż, IHAR, Kraków

Białka gluteninowe o niskiej masie cząsteczkowej jako markery biochemiczne w hodowli pszenicy

Low molecular weight glutenins as biochemical markers in wheat breeding

Opracowano nową metodę rozdzielania białek gluteninowych o niskiej masie cząsteczkowej (LMW GS) w oparciu o zasadę stopniowej ekstrakcji białek ziarniaków pszenicy, przy użyciu 50% izopropanolu. Do badań wybrano dziewiętnaście odmian i rodów pszenicy ozimej o znanym składzie podjednostek białek gluteninowych o wysokiej masie cząsteczkowej (HMW GS) i zróżnicowanych pod względem właściwości technologicznych mąki. LMW GS ekstrahowano z mąki i pojedynczych ziarniaków wybranych genotypów i analizowano metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym. Wśród poszczególnych odmian i rodów obserwowano od ośmiu do dziesięciu prążków elektroforetycznych różniących się pod względem masy cząsteczkowej i występujących w różnych kombinacjach, specyficznych dla badanych genotypów. Analizowano zróżnicowanie podjednostek LMW GS w grupach odmian i rodów różniących się pod względem HMW GS (5+10 i 2+12) oraz jakością technologiczną. Zidentyfikowano szereg frakcji w strefie białek o większej prędkości migracji, różnicujących odmiany wysoko- i niskojakościowe. Sugeruje to istnienie związku genetycznego pomiędzy LMW GS, a cechami jakościowymi badanych form pszenicy.

Słowa kluczowe: białka gluteninowe o niskiej masie cząsteczkowej (LMW GS), białka gluteninowe o wysokiej masie cząsteczkowej (HMW GS), elektroforeza PAGE, liczba sedymentacji

A method of low molecular weight glutenins (LMW GS) separation based on sequential extraction of wheat kernel proteins with 50% isopropanol was worked out. Nineteen cultivars and strains of winter wheat of known high molecular weight glutenin (HMW GS) composition and variable in flour technological properties were investigated. LMW GS extracted from flour and single kernels of chosen genotypes were resolved in polyacrylamide gel electrophoresis. Eight to ten protein bands differing in molecular weight and specific for individual wheats were observed. Differences in LMW GS composition between high and low quality cultivars in groups containing HMW GS 5+10 and 2+12 were analyzed. A number of protein bands differentiating high and low quality genotypes were identified. A possible relationship between LMW GS polymorphism and quality was discussed.

Key words: low molecular weight glutenin subunits (LMW GS), high molecular weight glutenin subunits (HMW GS), PAGE electrophoresis, sedimentation value

WSTĘP

Gluteniny stanowią grupę białek zapasowych odgrywających kluczową rolę w kształtowaniu cech jakościowych pszenicy. Powszechnie akceptowany jest pogląd, iż właściwości reologiczne kompleksu glutenowego związane są z występowaniem lub brakiem określonych podjednostek tych białek.

Przyjmując za podstawę klasyfikacji masę cząsteczkową podjednostek (a co za tym idzie ich prędkość migracji w żelu poliakryloamidowym) gluteniny dzieli się na frakcje o wysokiej (HMW GS) oraz o niskiej (LMW GS) masie cząsteczkowej (Payne i Corfield, 1979). O ile frakcje HMW GS zostały stosunkowo dokładnie poznane i opisane zarówno pod względem sposobu ich dziedziczenia jak też związku z jakością technologiczną, o tyle frakcje LMW GS są wciąż przedmiotem badań i dyskusji. Stanowią one specyficzną grupę białek glutenowych. Pod względem budowy chemicznej lokują się pomiędzy ω-gliadynami, a HMW GS (Beckwith, 1966). Od tych pierwszych różnią się głównie obecnością reszt cysteiny, dzięki którym mogą łączyć się za pośrednictwem wiązań disulfidowych (SS), a tym samym tworzyć dłuższe łańcuchy białkowe zbudowane z większej liczby polipeptydów. Ta cecha z kolei zbliża je do HMW GS, od których różnią się jednak niższą masą cząsteczkową (Wrigley, 1996).

LMW GS wykazują również specyfikę pod względem genetycznych uwarunkowań syntezy polipeptydów. Trzy grupy loci warunkujących podjednostki LMW GS zbudowane są z kilku silnie sprzężonych genów zlokalizowanych głównie na krótszych ramionach chromosomów 1A, 1B i 1D w bliskim sąsiedztwie głównych loci gliadyn (Jackson i in., 1983). Podobnie jak w przypadku innych białek glutenowych loci LMW GS tworzą serie alleli wielokrotnych. Konsekwencją zróżnicowania genetycznego jest polimorfizm ich budowy fizykochemicznej obserwowany u odmian i rodów pszenicy (Gupta i MacRitchie, 1994).

Wykazano, iż niektóre LMW GS są zdolne do tworzenia dwóch międzycząsteczkowych wiązań SS, przez co wspomagają proces polimeryzacji i przyczyniają się do kształtowania unikalnych właściwości reologicznych glutenu. Inne, zdolne to tworzenia tylko jednego wiązania SS wykazują przeciwstawne działanie pełniąc funkcję przerywacza procesu polimeryzacji (Kasarda, 1989). Zdaniem niektórych autorów ich rola w kształtowaniu cech jakościowych jest porównywalna z HMW GS (Gupta i in., 1989). Sugeruje to, iż łączne wykorzystanie obu grup białek zapasowych jako markerów pozwoli uzyskać bardziej obiektywny obraz zależności pomiędzy ich budową fizykochemiczną, a zmiennością tych cech niż w przypadku, gdy każda z nich jest rozpatrywana indywidualnie.

Powszechnie uważa się, iż podjednostki HMW GS 5+10 są związane z wysoką, natomiast 2+12 z niską jakością technologiczną. Jednak wśród odmian uprawnych i rodów hodowlanych można niekiedy obserwować genotypy o niskiej jakości zawierające *Glu D1-5+10*, jak również genotypy wysokojakościowe zawierające *Glu D1-2+12* (Bedo i in., 1995). Prawdopodobnie wspomniane rozbieżności mogą wynikać ze specyficznych kombinacji podjednostek LMW GS u odmian i rodów pszenicy, jak również ich interakcji z podjednostkami ciężkimi w strukturach przestrzennych matrycy glutenowej.

Celem niniejszej pracy była charakterystyka LMW GS wybranych odmian i rodów pszenicy ozimej, na podstawie metody rozdziału elektroforetycznego opracowanej w ZOJiMHZ IHAR w Krakowie oraz stwierdzenie, czy zmienność LMW GS w grupach form zawierających określone podjednostki HMW GS może być powiązana ze zmiennością ich właściwości technologicznych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano dziewiętnaście odmian i rodów pszenicy ozimej zróżnicowanych pod względem właściwości wypiekowych mąki. Wybrany materiał pochodził z kolekcji roboczej HR Strzelce Sp. z o.o. zebranej w 2005 roku.

Właściwości technologiczne uzyskanych form pszenicy określono na podstawie testu sedymentacji (Axford i in., 1979). Podjednostki HMW GS zidentyfikowano na podstawie obrazów elektroforetycznych SDS PAGE i katalogu bloków białek gluteninowych Payne'a (Payne i Lawrence, 1983).

Białka LMW GS analizowano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym według zmodyfikowanej metodyki opracowanej przez Singh i wsp. (1991). Naważkę 0,2 g mąki oczyszczano z lekkich białek albuminowych i globulinowych 50% roztworem izopropanolu, a następnie białka glutenowe ekstrahowano 50% izopropanolem o pH = 7,9. Celem uwolnienia monomerów wiązania SS oczyszczonych białek zredukowano ditiotritolem, a następnie alkilowano dodatkiem winylopirydyny. Grupę LMW GS wydzieleno metodą frakcjonowanego strącania acetonem. Po odwirowaniu i rozpuszczeniu ekstrakty białkowe wprowadzano do studzienek uformowanych w żelu poliakrylamidowym. Jako roztworu elektrodowego (zarówno przy anodzie jak i katodzie) użyto rozcieńczonego (ok. 0,15%) roztworu kwasu octowego. Rozdziały elektroforetyczne prowadzono w komorach firmy BioRad (Mini Protean III) przez około 2 godziny, a następnie żele barwiono w roztworze komasyny (Coomassie Brilliant Blue R250 + G250) i odbarwiano przez dobę w wodzie. Uzyskane obrazy elektroforetyczne fotografowano techniką cyfrową.

WYNIKI

Dziewiętnaście odmian i rodów pszenicy ozimej analizowano pod kątem zróżnicowania białek HMW GS metodą SDS-PAGE oraz pod względem właściwości technologicznych, które oszacowano na podstawie liczby sedymentacji. Analizowany materiał badawczy podzielono na dwie grupy pod względem *locus Glu D1*. Pierwsza obejmowała genotypy zawierające podjednostki 5+10, natomiast druga — 2+12. Pomimo, iż średnia wartość liczby sedymentacji form zawierających *Glu D1*-5+10 (42,67 mL) była wyższa niż form zawierających *Glu D1*-2+12 (33,31 mL) to jednak w grupach obserwowano znaczne zróżnicowanie pod względem tej cechy (współczynniki zmienności odpowiednio: 36,26% i 24,76%) (tab. 1).

Tabela 1

**Podział badanych materiałów na klasy jakości w grupach odmian i rodów zawierających podjednostki
Glu D1-5+10 oraz *Glu D1-2+12***

Repartition of analyzed winter wheat's according to quality and the presence of HMW GS *Glu D1-5+10* and *Glu D1-2+12*

Odmiany Cultivars	locus <i>Glu A1</i>	locus <i>Glu B1</i>	locus <i>Glu D1</i>	LS*	CV(%)**	Klasy jakości Classes of quality
STH 146	N	7+9	5+10	26	36,26	A1
60 A	N	6+8	5+10	27		
Rywalka	N	7+9	5+10	40		A2
Soraja	N	7+9	5+10	45		
Korweta	N	7+8	5+10	51	A3	
Ostka Strzelecka	1	7+9	5+10	67		
		średnia — average		42,67		
Elena	N	7+9	2+12	22	24,76	B1
STH 183	N	7+9	2+12	23		
STH 5295/1	N	7+9	2+12	24		
STH 650	N	7+9	2+12	27		B2
Jawa	N	7+9	2+12	29		
STH 490	N	6+8	2+12	31		
Tonacja	N	7+9	2+12	33	B3	
Kris	1	7+9	2+12	34		
STH 626	1	7+9	2+12	37		
STH 764	N	17+18+9	2+12	40		
Orkisz	N	7+9	2+12	42		
Sukces	N	7+9	2+12	45		
STH 5338	N	6+8	2+12	46		
		średnia — average		33,31		

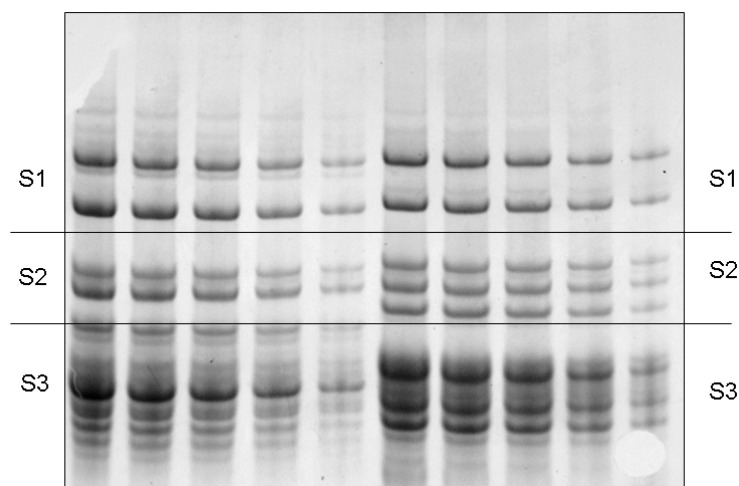
* LS — Liczba sedymentacji ;Sedimentation value

** CV (%) — Współczynnik zmienności; Coefficient of variability

Dla każdej z nich utworzono trzy podgrupy: o niskiej, średniej i wysokiej wartości liczby sedymentacji i oznaczono je symbolami: A1, A2 i A3 (dla form zawierających *Glu D1-5+10*) oraz B1, B2 i B3 (dla form zawierających *Glu D1-2+12*).

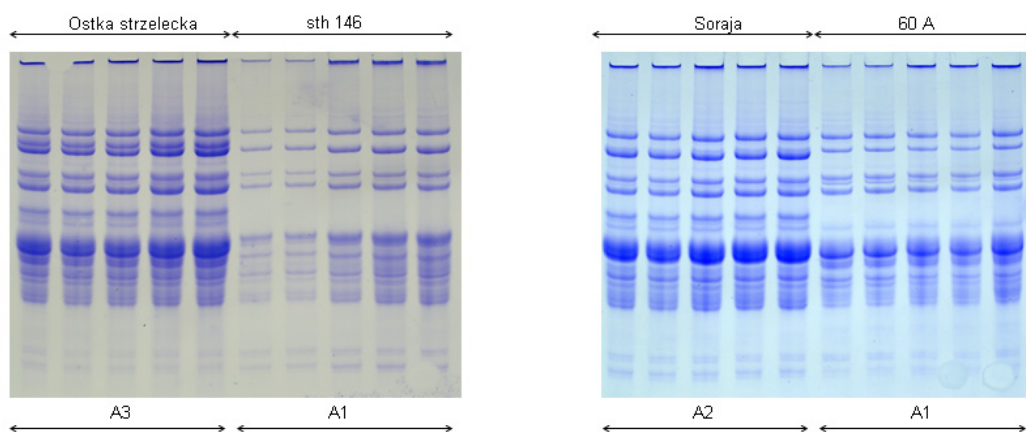
Opracowana metoda rozdziału elektroforetycznego LMW GS pozwala wyodrębnić od 8 do 10 prążków elektroforetycznych u różnych odmian i rodów pszenicy ozimej. Prawdopodobnie wszystkie stanowią białka gluteninowe o niskiej masie cząsteczkowej, chociaż na obecnym etapie badań nie można jednoznacznie wykluczyć obecności gliadyn czy też śladowych ilości HMW GS wśród rozdzielonych frakcji białkowych. Badane formy zawierają kombinacje prążków różniących się prędkością migracji, a obserwowany polimorfizm jest podobnie jak w przypadku innych białek glutenowych — uzależniony od genotypu. Prążki obserwowane na obrazach elektroforetycznych podzielono na trzy strefy, które oznaczono symbolami: S1, S2 i S3 (rys. 1).

Porównywano specyfikę obrazów elektroforetycznych LMW GS w grupie wybranych odmian i rodów zawierających podjednostki 5+10 HMW GS i charakteryzujących się skrajnie różnymi wartościami liczby sedymentacji (podgrupy A3 i A2 oraz A1) (rys. 2).



Rys. 1. Trzy strefy obrazu elektroforetycznego białek gluteninowych o niskiej masie cząsteczkowej (LMW GS)

Fig. 1. Electrophoregrams of low molecular weight glutenins divided into three zones



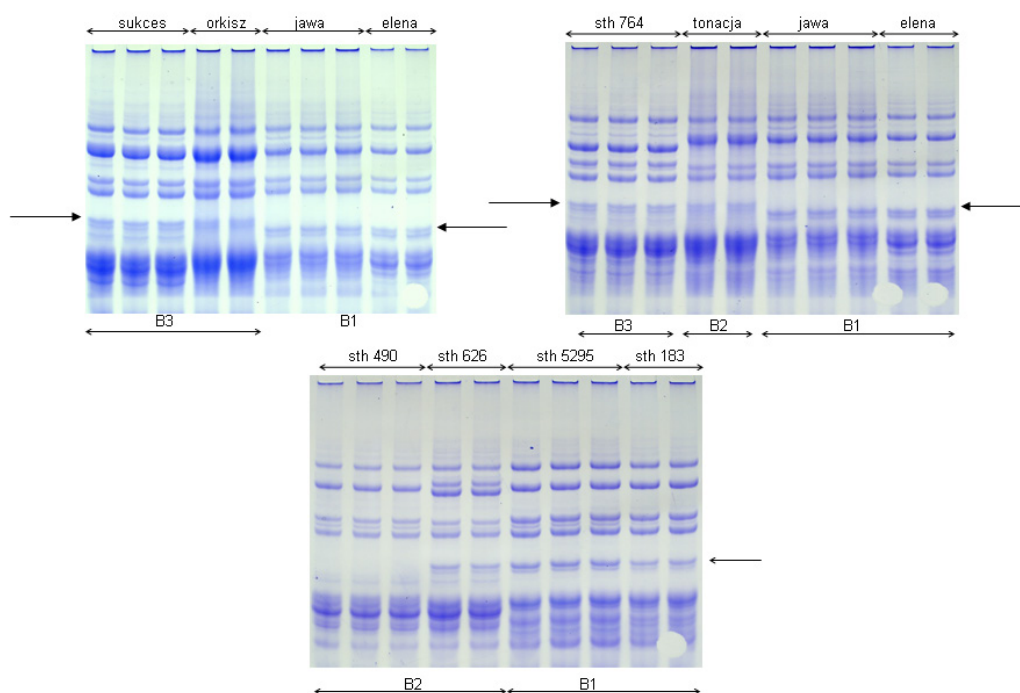
Rys. 2. Porównanie obrazów elektroforetycznych LMW GS w grupie form pszenicy ozimej zawierających podjednostki HMW GS *Glu D1-5+10*

Fig. 2. Comparison of LMW GS electrophoregrams in the group of the *Glu D1-5+10* containing cultivars and strains of winter wheat

Charakterystyczną cechą odróżniającą formy o wysokiej i niskiej liczbie sedymentacji jest obecność frakcji LMW GS zlokalizowanej na pograniczu stref S2 i S3 (zaznaczona strzałką) w środkowej i dolnej strefie obrazu elektroforetycznego. Frakcja ta pojawiła się u dwóch form o wysokiej jakości (Ostka strzelecka i Soraja) natomiast nie obserwowano

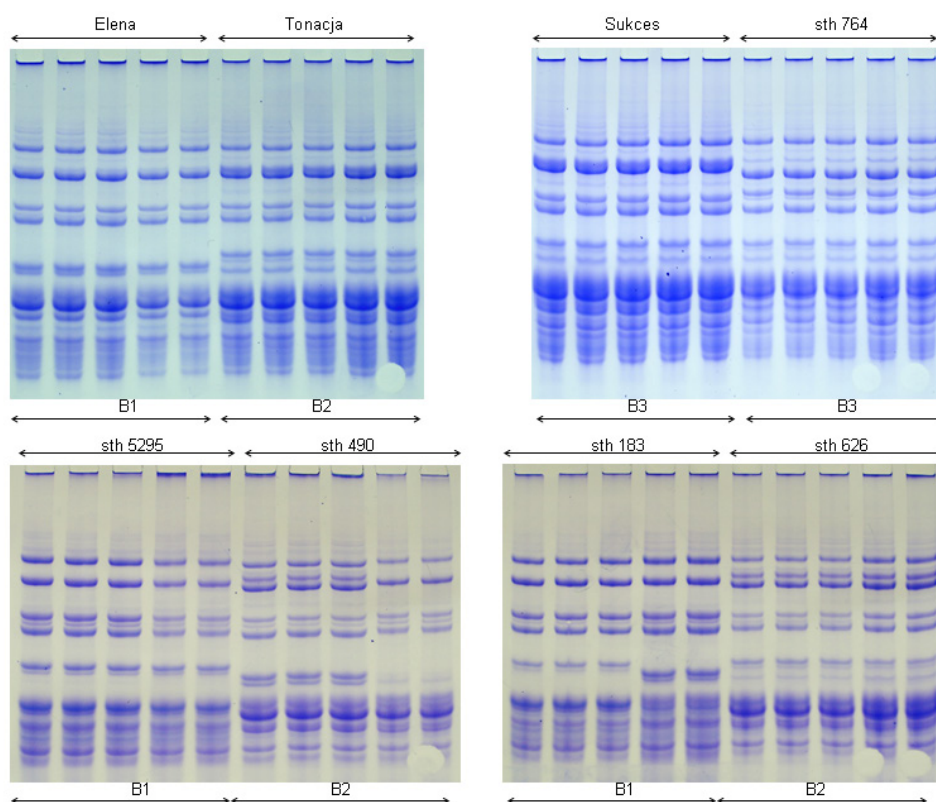
jej u żadnej spośród dwóch form o niskiej jakości, zawierających podjednostki 5+10 HMW GS (rodu STH 146 oraz linii 60A).

Porównując LMW GS form wysoko- i niskojakościowych w grupie odmian i rodów zawierających podjednostki 2+12 HMW GS uwagę zwraca (podobnie jak w przypadku form zawierających *Glu D1-5+10*) kombinacja wolno migrujących prążków w strefie S3 (rys. 3). Odmiany Sukces i Tonacja, ród STH 764 oraz wybrany genotyp orkisz, które charakteryzowały się wysokimi wskaźnikami testu sedymentacji zawierały w tej strefie obrazu elektroforetycznego frakcje białkowe wolniej migrujące niż w analogicznej strefie u odmian niskojakościowych Jawa i Elena. Ten charakterystyczny szczegół genotypów należących do grup B3 i B1 zaznaczono strzałkami.



Rys. 3. Porównanie obrazów elektroforetycznych LMW GS w grupie form pszenicy ozimej zawierających podjednostki HMW GS *Glu D1-2+12*
Fig. 3. Comparison of LMW GS electrophoregrams in the group of the *Glu D1-2+12* containing cultivars and strains of winter wheat

Porównując genotypy w grupach B1 i B2 zaobserwowano, że dwie formy o niskiej liczbie sedymentacji (STH 5295 i STH 183) zawierały charakterystyczny prążek na granicy stref S2 i S3, natomiast wśród form o średnich wartościach liczby sedymentacji jeden ród (STH 626) zawierał tę frakcję, a w drugim z nich (STH 490) nie obserwowano żadnych białek w rozpatrywanej strefie obrazu LMW GS.



Rys. 4. Analiza wyrównania genetycznego pod względem LMW GS. Dwa genotypy spośród ośmiu badanych są heterogeniczne
Fig. 4. Analysis of genetic purity in respect of LMW GS. Two of eight analyzed genotypes are heterogenic

Dla wybranych odmian i rodów wykonano analizę elektroforetyczną pojedynczych ziarniaków celem stwierdzenia czystości genetycznej badanych materiałów. Spośród ośmiu analizowanych genotypów tylko dwa — rody STH 183 i STH 490 — wykazały polimorfizm wewnątrzliniowy. Pierwszy z nich zawierał dwa biotypy: jeden zawierający prążek o mniejszej i jeden o większej prędkości migracji w strefie S3. Z kolei ród STH 490 składał się również z dwóch biotypów, z których jeden zawierał prążek o większej prędkości migracji w strefie S3, natomiast drugi nie wykazywał ekspresji genu białka zlokalizowanego w rozpatrywanej strefie obrazu elektroforetycznego.

DYSKUSJA

Opracowana metoda rozdzielania elektroforetycznego glutenin o niskiej masie cząsteczkowej okazała się efektywnym narzędziem analizy składu i różnicowania budowy fizykochemicznej podjednostek w tej grupie białek. Obrazy elektroforetyczne

pozwalają zidentyfikować od ośmiu do dziesięciu ostrych, wyraźnie widocznych prążków. Ich jakość jest porównywalna z jakością obrazów prezentowanych w innych pracach związanych z dziedziczeniem i analizą właściwości chemicznych LMW GS (Singh i in., 1991; Melas i in. 1994; Morel, 1994).

Uzyskane wyniki sugerują, że polimorfizm LMW GS obserwowany wśród badanych odmian i rodów pszenicy ozimej jest powiązany ze zmiennością jakości technologicznej oszacowanej na podstawie testu sedimentacji, co oznacza, że obrazy elektroforetyczne LMW GS, a w szczególności kombinacje prążków w strefie średnio i szybko migrujących frakcji oznaczonych symbolami S2 i S3, mogą być efektywnie wykorzystywane jako markery cech jakościowych, użyteczne w hodowli nowych odmian pszenicy. Podobne zależności zostały stwierdzone również przez innych autorów (Masci i in., 1991, Vaccino i in., 2002). Analiza związków z jakością dla prążków w strefie S1 wymaga dodatkowych badań.

W pracach nad polimorfizmem HMW GS oraz identyfikacją ich podjednostek u odmian i rodów pszenicy niejednokrotnie można spotkać formy o niskiej jakości, które zawierają korzystne (z punktu widzenia właściwości technologicznych) bloki białkowe (*Glu B1-7+9* czy *Glu D1-5+10*). Można zaobserwować też odwrotną zależność w przypadku form wysokojakościowych zawierających bloki powiązane z niską jakością (np. *Glu B1-6+8* czy *Glu D1-2+12*) (Bedo i in., 1995). Najbardziej prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest zróżnicowanie innych czynników mających wpływ na końcową wartość parametrów technologicznych genotypu. Jednym z takich czynników może być kombinacja podjednostek LMW GS. Obserwowana ich zmienność u badanych odmian i rodów pszenicy wyjaśnia do pewnego stopnia obserwowane rozbieżności w powiązaniach HMW GS z cechami jakościowymi. Uzyskany wynik sugeruje, że analiza zmienności podjednostek we wszystkich trzech grupach białek glutenowych: HMW GS, LMW GS oraz w gliadynach jest najbardziej racjonalną strategią wykorzystania elektroforetycznych markerów białkowych w hodowli nowych odmian pszenicy. W ten sposób zwiększa się prawdopodobieństwo identyfikacji genotypów wysokojakościowych w mieszańcowym potomstwie kombinacji krzyżowań, na podstawie obrazów elektroforetycznych. Wyniki badań innych autorów potwierdzają słuszność tej hipotezy (Gupta i in., 1989).

Biorąc pod uwagę różnice metodyczne przedstawionej metody analizy LMW GS oraz specyfikę uzyskanych rozdziałów, wyniki ich interpretacji zarówno pod względem genetycznym, jak i biochemicznym mogą nieznacznie odbiegać od schematów opisanych w literaturze (Gupta i MacRitchie, 1994). Zagadnienia te będą przedmiotem przyszłych badań.

LITERATURA

- Axford D. W. E., Mc Dermott E. E., Redman D. G. 1979. Dodecylo sulfate test of breadmaking quality: comparison with Pelshenke and Zeleny tests. *Cereal Chem.* 56 (6): 552.
- Beckwith A. C., Nielsen H. C., Wall J. S., Huebner F. R. 1966. Isolation and characterization of a high-molecular-weight protein from wheat gliadin. *Cereal Chem.* 43: 14 — 28.

- Bedo Z., Karpati M., Vida G., Kramarik-Kissimon J., Lang L. 1995. Good breadmaking quality wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes with 2+12 subunit composition at the *Glu-D1* locus. *Cereal Res. Commun.* Vol.23 No.3: 283 — 290.
- Gupta R. B., Singh N. K., Shepherd K. W. 1989. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theor. Appl. Genet.* 77: 57 — 64.
- Gupta R. B., MacRitchie F. 1994. Allelic variation at gluten subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1* of common wheats. II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. *Cereal Chem.* 19: 19 — 29.
- Gupta R. B., Paul J. G., Cornish G. B., Palmer G. A., Bekes F., Rathjen A. J. 1994. Allelic variation of glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1*, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties. *J. Cereal Sci.* 19, 9 — 17.
- Jackson E. A., Holt L. M., Payne P. I. 1983. Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localization of their controlling genes. *Theor. Appl. Genet.* 66: 29 — 37.
- Kasarda D. D. 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. In: Pomeranz Y. (eds.), *Wheat is unique*. American Association of Cereal Chemistry, St Paul, MN: 277 — 302.
- Masci S. M., Porceddu E., Colaprico G., Lafiandra D. 1991. Comparison of the B and D subunits of glutenin encoded at the *Glu-D3* locus in two biotypes of the common wheat cultivar Newton with different technological characteristics. *J. Cereal Sci.* 14: 35 — 46.
- Melas V., Morel M. H., Autran J. C., Feillet P. 1994. Simple and rapid method for purifying low molecular weight subunits of glutenin from wheat. *Cereal Chem.* 71 (3): 234 — 237.
- Morel M. H. 1994. Acid-polyacrylamide gel electrophoresis of wheat glutenins: a new tool for the separation of high and low molecular weight subunits. *Cereal Chem.* 71 (3): 238 — 242.
- Payne P. I., Corfield K. G. 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta* 145: 83 — 88.
- Payne P. I., Lawrence G. J. 1983. Catalogue of alleles for the complex loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.* 11: 29 — 35.
- Singh N. K., Shepherd K. W., Cornish G. B. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.* 14: 203 — 208.
- Vaccino P., Redaelli R., Metakovsky E. V., Borghi B., Corbellini M., Pogna N. E. 2002. Identification of novel low MW glutenin subunits in the high quality bread wheat cv. Salmone and their effects on gluten quality. *Theor. Appl. Genet.* 105: 43 — 49.
- Wrigley C. W. 1996. Giant proteins with flour power. *Nature* 381: 738 — 739.