

MIŁOSZ SMOLIK**DANUTA RZEPKA-PLEVNEŠ****KATARZYNA GRYS**

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych

Akademia Rolnicza w Szczecinie

Genetyczne zróżnicowanie białek zapasowych kilkunastu odmian pszenżyta ozimego (*X Triticosecale* Wittmack)

Genetic variability of storage proteins in some winter triticale (*X Triticosecale* Wittmack) varieties

Celem niniejszej pracy było określenie genetycznego polimorfizmu 15 odmian pszenżyta (Dagro, Moniko, Salvo, Fidelio, Lamberto, Pronto, Kitaro, Woltario, Tevo, Disco, Moreno, Presto, Prego, Chrono, Lasko) w oparciu technikę SDS-PAGE. Na otrzymanych dla wymienionych odmian pszenżyta elektroforegramach obserwowano od 19 (Presto) do 27 (Salvo, Fidelio i Lamberto) prążków białkowych. Ich masa wahała się od 105,8 do 18,4 kDa. W zależności od masy zaliczono je do czterech frakcji białkowych: HMW, ω , γ_{75} , γ_{40} o masach odpowiednio: > 100 , $100 - 75$, $75 - 40$ i < 40 kDa. We frakcji białek najcięższych — HMW, u większości odmian stwierdzono obecność 2 polipeptydów o masie 105,8 i 101 kDa. Wyjątek stanowiły odmiany: Dagro, Lamberto i Kitaro, u których w omawianej frakcji białek wykazano obecność 1 polipeptydu o masie 101 kDa. We frakcji białek ω wykazano obecność od 1 (Kitaro) do 6 (odmiana Lamberto) prążków białkowych. Polimorficznymi okazały się prążki o masie: 99,2; 95,09; 87,9; 83,44 i 81,6 kDa. Obserwowano je bowiem na elektroforegramach w różnych układach. Frakcja białek γ_{75} liczyła od 7 do 9 prążków o masie od 74,9 do 41,9 kDa. Polimorficznymi okazały się polipeptydy: 72,31; 70; 68,8 i 65,11 kDa. Najlżejsza frakcja białek zapasowych γ_{40} liczyła od 9 do 12 prążków białkowych o masie od 39,6 do 18,4 kDa. Analiza drzewa podobieństwa filogenetycznego wykazała, że badane odmiany pszenżyta były do siebie podobne w zakresie od 73,7 do 93,6%. Podzielono je przy tym na 5 różnych grup podobieństw genetycznych.

Słowa kluczowe: gliadyny, odmiany, polimorfizm, pszenżyto, SDS-PAGE

The aim of this work was to determine the genetic polymorphism of 15 varieties of triticale (Dagro, Moniko, Salvo, Fidelio, Lamberto, Pronto, Kitaro, Woltario, Tevo, Disco, Moreno, Presto, Prego, Chrono, Lasko) on the basis of SDS-PAGE technique. From 19 (Presto) to 27 (Salvo, Fidelio and Lambert) protein bands were observed on the electrophoregrams obtained for the above triticale varieties. Their weight varied from 105.8 to 18.4 kDa. According to the weight they were classified in four protein fractions: HMW, ω , γ_{75} and γ_{40} with weight: > 100 , $100 - 75$, $75 - 40$, and < 40 kDa, respectively. In the fraction including the heaviest proteins (HMW) the majority of varieties showed

the presence of 2 polypeptides of 105.8 and 101 kDa. The exception were varieties Dagro, Lamberto and Kitaro because they showed the presence of 1 polypeptide of 101 kDa. In fraction ω the presence of 1 (Kitaro) to 6 (Lamberto) protein bands was observed. The bands of 99.2, 95.09, 87.9, 83.44 and 81.6 kDa appeared to be polymorphic. In this fraction, they were observed on the electrophoregrams in different arrangements. Protein fraction γ_{75} consisted of 7 to 9 bands of weight ranging from 74.9 to 41.9 kDa. The polypeptides 72.31, 70; 68.8; and 65.11 kDa turned out to be polymorphic. The lightest fraction of the storage proteins (γ_{40}) contained 9 to 12 protein bands of weight ranging from 39.6 to 18.4 kDa. The analysis of the tree of the phylogenetic similarity showed that the examined varieties of triticale were similar to each other in the range from 73.7 to 93.6%. They were divided into 5 different groups of genetic similarities.

Key words: gliadins, polymorphism, SDS-PAGE, triticale, varieties

WSTĘP

Dynamicznie rozwijająca się biologia molekularna stworzyła nowe metody analizowania zmienności genetycznej (Waga, 1987; Marczewski, 1995). Znalazły one szerokie zastosowanie w charakterystyce materiałów wyjściowych, ocenie odrębności genetycznej odmian, ich wyrównania i trwałości a przede wszystkim w wykrywaniu markerów cech.

U roślin zbożowych szczególnie interesującą grupę markerów stanowią prolaminy — białka zapasowe ziarniaków zbóż (Sozinov, 1987; Waga, 1991). Są one bezpośrednimi produktami działania genów, a na zmienność w ich obrębie nie wpływają czynniki środowiskowe (Waga, 1987).

Zdaniem większości autorów charakterystyka prolamin prowadzona z zastosowaniem elektroforezy SDS-PAGE umożliwia w sposób dokładny, szybki i powtarzalny charakterystykę tej grupy białek, rozszerzając tym samym opis badanych odmian roślin zbożowych.

Celem niniejszej pracy było określenie różnic genotypowych między badanymi odmianami pszenżyta w oparciu o analizę składu frakcji białek zapasowych przy użyciu elektroforezy SDS-PAGE.

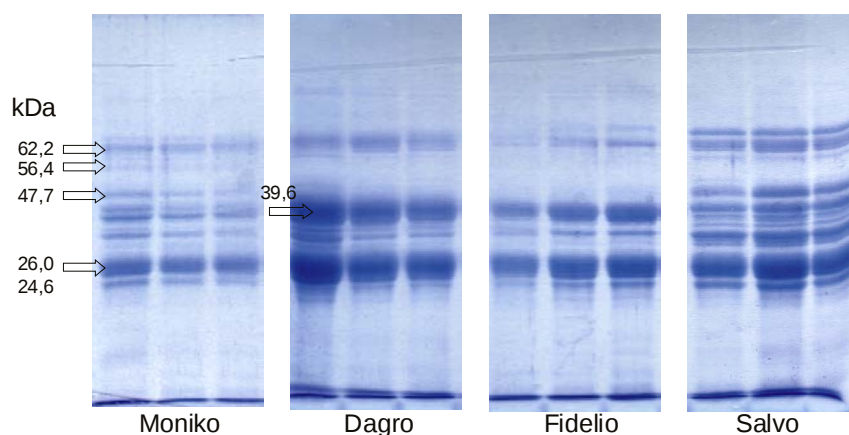
MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły ziarniaki 15 odmian pszenżyta otrzymane z Hodowli Odmian „Danko” Sp. z o.o. Oddział Małyszyn (Chrono) z Hodowli Roślin: Oddział Dębina (Dagro, Moniko, Salvo, Woltario), Oddział Dańków (Kitaro, Tewo, Prego), Oddział Łaski (Fidelio, Pronto, Disco, Lasko) i Oddział Choryń (Moreno, Presto, Lamberto). Białka zapasowe wymienionych genotypów pszenżyta izolowano, rozdzielano elektroforetycznie i barwiono według metod opisanych przez Westermeiera (1997). Prolaminy ekstrahowano z mąki otrzymanej z przemiału 5 pojedynczych ziarniaków każdej z badanych odmian pszenżyta. Do izolacji białek z tak otrzymanej próbki zastosowano 400 μ l — 70% etanolu. Po 18 godzinnej inkubacji próbki zwirowano, a następnie suszono 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 ilościach, odpowiednio: 15,2; 4,0; 3,20; 6,40; 1,60 i 1,60 ml w przeliczeniu na 32 ml buforu ekstrakcyjnego. Rozdziały elektroforetyczne przeprowadzono najpierw dla prolamin izolowanych z 5 losowo

wybranych ziarniaków każdej z odmian pszenżyta. Po sprawdzeniu ich jednorodności genetycznej, dla każdej z nich tworzono próbkę zbiorczą składającą się z 40 µl roztworu gliadyn każdego z przebadanych wcześniej ziarniaków. Na żel nanoszono po 15 µl próbki zbiorczej. Elektroforezę prowadzono w układzie nieciągłym w dwóch rodzajach żeli poliakrylamidowych — zagęszczającym (4%) i rozdzielającym (12,5%) w obecności buforu Tris-glicyna z dodatkiem soli sodowej siarczany dodecylu (SDS). Żele polimeryzowano dodając do mieszaniny akrylamidów 15 µl TEMED-u i 150 µl 10% APS (nadsiarczany amonu). Rozdział białek prowadzono w aparacie Multiphor II (Pharmacia LKB), przy stałym natężeniu prądu 50 mA. Wzorcem masowym była mieszanina białek rekombinowanych o masach od 14,4 do 116,0 kDa (Fermentas MBI). Po zakończeniu rozdzielania żele barwiono w roztworze Coomassie Brilliant Blue R-250, a po odbarwieniu utrwalano w 20% roztworze glicerolu. Wysuszone żele skanowano (Sharp JX-330 — Pharmacia LKB), a otrzymane obrazy cyfrowe opracowywano w oparciu o pakiet programu komputerowego „Diversity one 1.3” (Pharmacia LKB). Ustalono liczbę i masę wyodrębnionych na żelu prążków białkowych, klasyfikując je w zależności od masy do odpowiednich frakcji białkowych. Na podstawie obliczonych współczynników podobieństwa genetycznego i analizy skupień UPGMA wykreślono drzewo podobieństwa filogenetycznego (Diversity one 1.3 — Pharmacia LKB).

WYNIKI

Elektroforetyczna analiza białek zapasowych izolowanych z pojedynczych ziarniaków każdej z odmian pszenżyta wykazała ich jednorodność genetyczną (rys. 1).



Rys. 1. Elektroforegramy białek zapasowych izolowanych z pojedynczych ziarniaków wybranych odmian pszenżyta

Fig. 1. Electrophoregrams for storage proteins isolated from individual grains of triticale varieties

Natomiast w obrębie omawianych białek 15 badanych w doświadczeniu odmian pszenżyta stwierdzono dużą zmienność w składzie polipeptydów. Przejawiała się ona

różną liczbą prążków w poszczególnych frakcjach białkowych. Frakcja białek najcięższych (HMW o masie powyżej 100 kDa) liczyła od 1 do 2 prążków o masie od 108,5 do 101 kDa (tab. 1). We frakcji białek ω (100 — 75 kDa) stwierdzono obecność od 1 do 6 polipeptydów, o masie od 99,2 do 76,8 kDa. Frakcję białek γ_{75} reprezentowało od 7 do 10 prążków o masie od 74,9 do 42 kDa, zaś we frakcji białek najlżejszych — γ_{40} widocznych było od 8 do 12 polipeptydów. Ich masa wynosiła od 39,6 do 18,4 kDa.

Ogółem na elektroforegramach obserwowano od 19 do 26 polipeptydów, najwięcej — 26 u odmian: Salvo, Fidelio i Lamberto, najmniej — (19) u odmiany Presto.

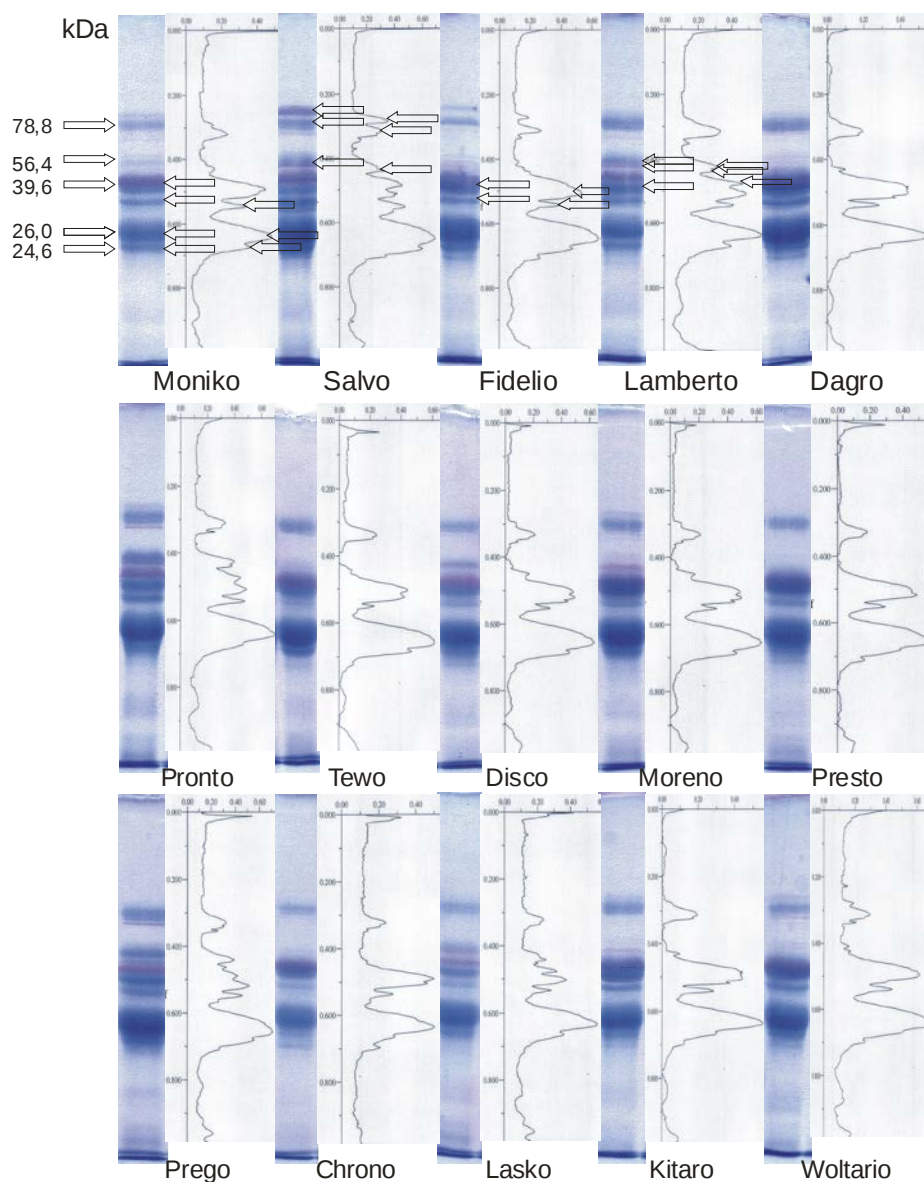
Tabela 1

Liczba prążków białkowych w poszczególnych frakcjach białek badanych odmian pszenżyta
Numbers of protein bands in separated fractions for triticale varieties

Odmiana Varieties	HMW > 100 kDa	ω 100–75	γ_{75} 75–40	γ_{40} < 40	Liczba prążków ogółem Total number of bands
Dagro	1	2	9	9	21
Moniko	1	5	8	8	22
Salvo	1	4	10	11	26
Fidelio	1	6	9	10	26
Lamberto	1	6	9	10	26
Pronto	1	5	8	10	24
Kitaro	1	4	8	10	23
Woltario	2	4	7	8	21
Tewo	2	5	8	9	24
Disco	2	3	8	8	21
Moreno	2	4	8	8	22
Presto	2	1	7	9	19
Prego	2	4	8	10	24
Chrono	2	4	7	10	23
Lasko	2	3	8	9	22
max - min	1–2	1–6	7–10	8–12	19–26
Masa prążków w kDa Mass of bands in kDa	101–108,5	76,8–99,2	74,9–42	39,6–18,4	

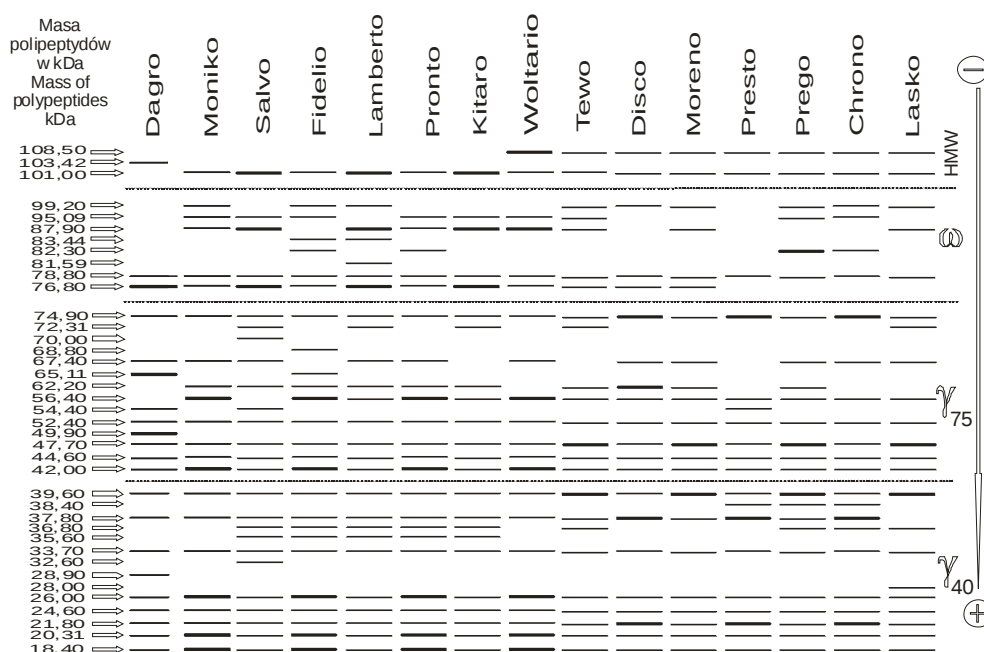
Polimorfizm białek zapasowych charakteryzowanych odmian pszenżyta przejawiał się przede wszystkim różnym układem polipeptydów, specyficznych dla danej odmiany. Ten polimorfizm przedstawiono na rysunku 2 w formie analizy elektroforetycznej i densytometrycznej. Analiza densytogramów wykreślonych dla odpowiednich profili białkowych potwierdziła obserwowany na elektroforegramach, duży zakres zmienności między badanymi odmianami pszenżyta. Przy czym wykorzystano ją jedynie do analizy jakościowej (obecność lub brak pików na densytogramie), obserwowanych w profilach białkowych, polipeptydów.

We frakcji białek HMW stwierdzono obecność trzech polipeptydów o masach: 108,5; 103,42 i 101 kDa widocznych na elektroforegramach w postaci jednego lub dwóch prążków. Charakterystycznym tylko dla odmiany Dagro, okazał się prążek o masie 103,42 kDa.



Rys. 2. Densytometryczna analiza elektroforetycznych rozdzielów białek zapasowych pszenżyta
Fig. 2. Densitometric analysis of electrophoretic storage protein patterns for triticale varieties

U odmian: Moniko, Salvo, Fidelio, Lamberto, Pronto i Kitaro wykazano obecność jednego prążka o masie 101 kDa. U pozostałych zaś odmian obserwowano dwa prążki o masach: 108,5 i 101 kDa (rys. 3).



Rys. 3. Elektroforetyczne obrazy białek zapasowych odmian pszenżyta
Fig. 3. Electrophoretic protein patterns for triticale varieties

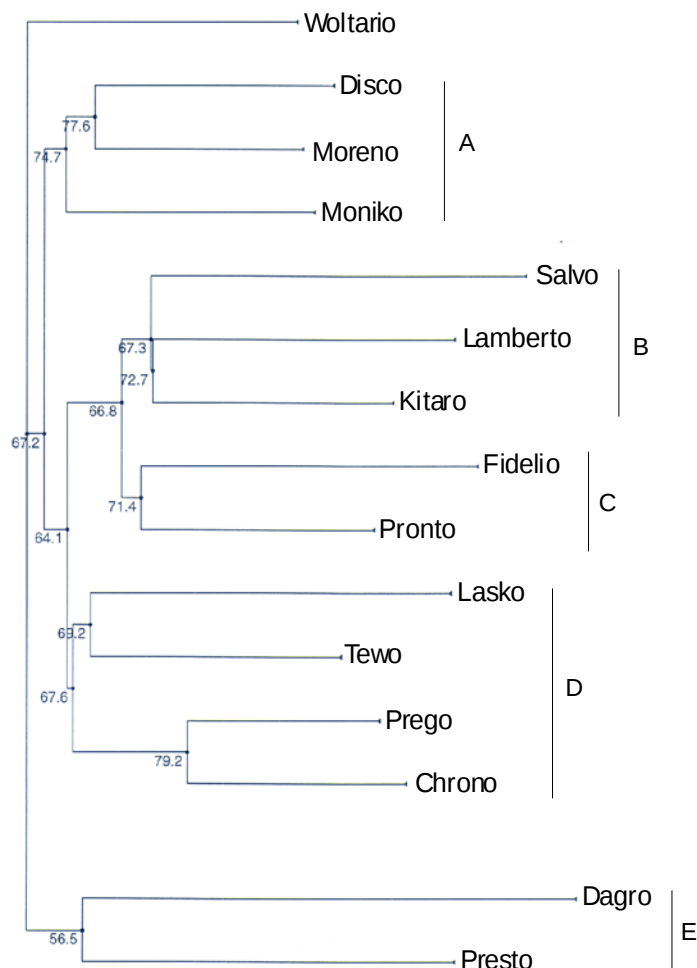
W drugiej z kolei frakcji białek ω wyróżniono od 1 do 6 prążków. Jeden prążek o masie 78,8 kDa był obecny na elektroforegramie odmiany Presto, sześć (o masach od 99,2 do 76,8 kDa) — u odmiany Lamberto. U pozostałych odmian wykazano obecność 3, 4 i 5 polipeptydów (rys. 3). Prążki tej frakcji tworzyły, podobnie jak prążki frakcji HMW, specyficzne układy elektroforetyczne pozwalające zróżnicować większość badanych odmian pszenżyta. Wyjątek stanowiły odmiany Prego i Chrono; Salvo i Woltario oraz Moniko i Tewo o tym samym układzie prążków białkowych (rys. 3).

We frakcji gliadyn — γ_{75} badanych odmian pszenżyta stwierdzono obecność od 7 do 9 polipeptydów tworzących, specyficzne wzory prążkowe charakterystyczne dla poszczególnych odmian pszenżyta. Identyczne układy prążków białkowych stwierdzono dla trzech grup odmian: Moniko, Pronto, Disco, Moreno i Prego, u Chrono i Woltario oraz Kitaro i Tewo.

Najliczniejszą, pod względem liczby wyodrębnionych polipeptydów, była frakcja gliadyn γ_{40} . Odznaczała się ona niewielkim zakresem zmienności. Na elektroforegramach większości odmian, w tej frakcji nie stwierdzono różnic w układach prążków. Wyjątek stanowiły odmiany: Dagro, Moniko, Salvo, Tewo, Presto i Lasko w obrazach których obecne były specyficzne dla nich prążki białkowe (32,6, 28,9, 28 kDa) oraz prążki (38,4, 36,8 i 35,6 kDa), pojawiające się w części badanych odmian (rys. 3).

Analiza dendrogramu podobieństwa filogenetycznego opracowanego w oparciu o zidentyfikowane na żelach prążki białkowe wykazała, że podobieństwo między

badanymi odmianami pszenżyta wahało się od 56,5 do 79,2% (rys. 4). Zaliczono je do 5 grup podobieństw. Do pierwszej grupy — A zaliczono odmiany: Disco, Moreno i Moniko podobne do siebie w granicach 73,5 do 77,6%, do grupy B — odmiany: Salvo, Lamberto i Kitaro (65,5 do 72,7%). Grupę C stanowiły odmiany: Fidelio i Pronto, grupę D odmiany: Lasko, Tewo, Prego i Chrono (69,2 do 79,2%). Do piątej grupy E — zaliczono odmiany: Dagro i Presto (56,5%). Wyjątek stanowiła odmiana Woltario wykreślona poza omówionymi grupami podobieństw.



A, B, C, D i E - grupy podobieństwa (%) - similarity groups (%)

Rys. 4. Dendrogram podobieństwa genetycznego wykreślony dla odmian pszenżyta w oparciu o elektroforetyczny układ białek

Fig. 4. Phylogenetic tree of genetic similarity between triticale varieties, drawn on the basis of electrophoretic protein patterns

DYSKUSJA

Efektem pionierskich prac zmierzających do opracowania logicznego systemu identyfikacji i klasyfikacji prolamin było połączenie metod opartych na biochemicznej i genetycznej ich charakterystyce (Drzewiecki, 1997; Waga, 2000). Uzyskany na drodze rozdziałów elektroforetycznych, w tym przede wszystkim elektroforezy SDS-PAGE, polimorfizm białek zapasowych uprawnych roślin zbożowych umożliwił między innymi charakterystykę uprawnych odmian i linii wsobnych: pszenic (Waga, 2000; Hegde i Singhal, 2000), żyta (Rzepka-Plevneš i Smolik, 2003; Smolik i Rzepka-Plevneš, 2003; Rzepka-Plevneš i in., 2004) i jęczmienia (Hsam i in., 1993).

W niniejszej pracy podjęto próbę scharakteryzowania genetycznej zmienności piętnastu polskich odmian pszenżyta ozimego. W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano istotny polimorfizm w obrębie białek zapasowych badanych odmian pszenżyta. Przejawiał się on różną liczbą zidentyfikowanych na żelach prążków białkowych, umożliwiając opracowanie dla nich schematycznych bloków białkowych z zaznaczeniem wspólnych i polimorficznych prążków. Otrzymane wyniki badań pozostają w zgodności z wynikami badań Igrejas i wsp. (1999). Wymienieni autorzy scharakteryzowali genetyczną zmienność gliadyn pszenżyta, poddając elektroforetycznej analizie frakcje białek kodowane genami: *Glu-1*, *Gli-1*, *Glu-3*, *Glu-B2* i *Gli-R2* oraz genami *Glu-1*, *Sec-2* i *Sec-3*. Autorzy ci wskazując na zróżnicowanie genetyczne odmian pszenżyta w obrębie analizowanych *loci*, potwierdzili przydatność elektroforezy SDS-PAGE do tego typu analiz.

Badania własne wykazały, że największą liczbą polipeptydów charakteryzowały się odmiany: Salvo, Fidelio i Lamberto, najmniejszą — odmiana Presto. Masa wyodrębnionych na elektroforegramach polipeptydów wahała się od 18,4 do 108,5 kDa. Najliczniejsze pod względem liczby polipeptydów u badanych odmian pszenżyta okazały się gliadyny γ_{40} , największy zaś ich polimorfizm stwierdzono we frakcji białek γ_{75} . Przedstawione wyniki są potwierdzeniem wyników otrzymanych w innej, poświęconej również elektroforetycznej charakterystyce odmian pszenżyta, pracy (Rzepka-Plevneš i in., 2003).

Różna ruchliwość elektroforetyczna gliadyn badanych odmian pszenżyta jest odzwierciedleniem pewnej odrębności genetycznej każdej z nich. Jest ona determinowana przez różne układy alleli, których widocznym efektem działania są wizualizowane na żelach prążki białkowe. Ocena ich układów połączona z analizą komputerową pozwala określać procent podobieństwa między nimi, wskazując jednocześnie produkty polimorficzne. W niniejszej pracy podobieństwo genetyczne badanych odmian pszenżyta było zróżnicowane i wynosiło od 56,5 do 79,2%.

WNIOSKI

1. Polimorfizm białek zapasowych badanych odmian pszenżyta dotyczy przede wszystkim masy cząsteczkowej wyodrębnionych w poszczególnych frakcjach polipeptydów. Wahała się ona od 18,4 do 108,5 kDa. Dla każdej z badanych odmian można było ustalić specyficzny dla niej wzór prążków białkowych.

2. Każda z badanych odmian charakteryzuje się specyficznym dla siebie składem białek zapasowych, potwierdzającym jej odrębność genetyczną od innych odmian.
3. Podobieństwo genetyczne między ozimymi odmianami pszenżyta mieściło się w granicach od 56,5 do 79,2%.
4. Elektroforeza SDS-PAGE białek zapasowych pszenżyta stanowi przydatne narzędzie identyfikacji odmian pszenżyta.

LITERATURA

- Drzewiecki J. 1997. Ocena tożsamości roślin rolniczych na podstawie nasion i siewek — stan obecny i nowe kierunki. Biul. IHAR 203: 13 — 21.
- 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 — 9.
- Hsam S. L., K., Schickle H., Westemeier R., Zeller F.J. 1993. Identification of cultivars of crop species by polyacrylamide electrophoresis. Monatsschrift für Bauwissenschaft 46: 86 — 94.
- Igrejas G., Guedes-Pinto H., Carnide V., Branlard G. 1999. Seed storage protein in triticales varieties commonly grown in Portugal. Plant Breeding, 118: 303 — 306.
- Marczewski W. 1995. Markery molekularne w genetyce i hodowli roślin. Postępy Biochemii. 41 (4): 237 — 243.
- Rzepka-Plevneš D., Smolik M. 2003. Polymorphism of the storage proteins in rye cultivars and populations selected for tolerance to nutrient deficiency. Plant Breed. Seed Sci. 48 (2/2): 49 — 59.
- Rzepka-Plevneš D., Smolik M., Krupa M. 2003. Zmienność elektroforetyczna białek zapasowych różnych odmian pszenżyta (X *Triticosecale* Wittmack). Biul. IHAR 226/227/1: 181 — 189.
- Rzepka-Plevneš D., Smolik M., Lebiecka K. 2004. Polimorfizm białek zapasowych wybranych form żyta (*Secale* sp.) określony techniką SDS-PAGE. Biul. IHAR 231:247 — 253.
- Smolik M., Rzepka-Plevneš D. 2003. Ocena zmienności genetycznej linii wsobnych i mieszańcowości żyta metodą SDS-PAGE. Biul. IHAR 226/227/2: 309 — 317.
- Sozinov A.A. 1987. Blocks of cereal storage proteins as genetic markers. Vavilov Institute of Cereal Genetics, USSR Academy of Science, Moscow
- Waga J. 1987. Białka gliadynowe i ich rola w hodowli pszenic. Biul. IHAR 164: 181 — 188.
- Waga J. 1991. Zróżnicowanie frakcji białek gliadynowych u wybranych form pszenicy ozimej i jarej. Hod. Rośl. Aklim. 35: 59 — 63.
- Waga J. 2000. Syntetyczna metoda klasyfikacji białek gliadynowych. Biul. IHAR 215: 35 — 61.
- Westemeier R. (ed.) 1997. Electrophoresis in practice. VCH Verlagsgesellschaft mBH.