

UTILIZATION OF PROTEIN MARKERS FOR IDENTIFICATION OF BREAD WHEAT CULTIVARS.

VYUŽITIE BIELKOVINOVÝCH MARKEROV PRI IDENTIFIKÁCIÍ GENOTYPOV PŠENICE LETNEJ FORMY OZIMNEJ.

Chňápek M., Gálová Z.

Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovenská republika.

E-mail: chnappek@afnet.uniag.sk, Zdenka.Galova@uniag.sk

ABSTRACT

Genetic markers, which offers possibility to identify and to verify samples on the basis of their genetic features are main tools for identification of plant genotypes. Therefore we have concentrated on analysis of wheat storage proteins by SDS-PAGE and A-PAGE and their utilization as a protein markers for identification of 45 genotypes of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Results obtained by SDS-PAGE shows, that all of analyzed materials were homogenous and single-line. There were observed 9 electrophoretical profiles and profile with HMW-GS composition 0, 7+9, 5+10 was the dominating one. Analysis of genotypes performed by A-PAGE was observing presence of secalin block in wheat genome. It was identified in 12 cases. On the basis of composition of HMW-GS and according to presence of secalin block it is possible to calculate Glu-score, which predict technological quality. From collection of 45 genotypes had 32 genotypes good technological quality.

Keywords: SDS PAGE, A-PAGE, HMW-GS, wheat, storage proteins

ABSTRAKT

Hlavným prostriedkom identifikácie rastlinných genotypov sú genetické markery. V nadväznosti na uvedené sme sa v našej práci zamerali na analýzu zásobných bielkovín zreých zŕn pomocou SDS-PAGE a A-PAGE a ich využitie ako bielkovinových markerov pre identifikáciu 45 genotypov pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.). Z dosiahnutých výsledkov realizovaných pomocou SDS-PAGE vyplynulo, že analyzované genotypy sú homogénne a jednolíniové, pričom bolo zistených 9 elektroforetických profilov. Majoritný podiel predstavoval genotyp s komponentnou skladbou HMW-GS 0, 7+9, 5+10. Analýza genotypov uskutočnená pomocou A-PAGE sledovala prítomnosť sekalínového bloku v genóme pšenice. V súbore sledovaných genotypov bol sekalínový blok identifikovaný v 12 prípadoch. Na základe komponentnej skladby HMW-GS a prítomnosti sekalínového bloku je možné vypočítať Glu-score, ktoré má vypovedaciu hodnotu vo vzťahu ku kvalite. Z kolekcie 45 genotypov pšenice letnej 32 genotypov môžeme charakterizovať ako genotypy s veľmi dobrou technologickou kvalitou.

Kľúčové slová: SDS-PAGE, A-PAGE, HMW-GS, pšenica, zásobné bielkoviny

ÚVOD

Postupy identifikácie a diferenciacie rastlinných genotypov by mali byť jednoznačné, s vysokou rozlišovacou schopnosťou, mali by byť dostatočne metodicky rýchle, manuálne jednoduché a finančne prístupné. Zároveň by mali mať vysokú kapacitu, teda možnosť analyzovať súčasne niekoľko stoviek vzoriek. Pri pšenici analýzy elektroforetických profilov zásobných bielkovín väčšinou vykazujú dostatočný polymorfizmus, a preto sú dosť používané pre účely diferenciacie odrôd, analýzy ich genetickej homogenity a v šľachtení na predikciu niektorých vlastností s nimi spojených. Vhodnými bielkovinovými markermi pri pšenici sú zásobné bielkoviny endospermu - gliadíny a gluteníny.

Zásobné bielkoviny sú v praxi najviac používaným typom rastlinných bielkovín pre účely identifikácie a diferenciacie genotypov. Sú lokalizované v špecializovaných rastlinných pletivách alebo orgánoch. Nachádzajú sa tu v dostatočnom množstve a sú relatívne ľahko extrahovateľné. Základnými elektroforetickými technikami a ich modifikáciami, v polyakrylamidových géloch, je možné tieto bielkoviny jednoduchým a rýchlym postupom rozdeliť, vizualizovať a ich profily v niektorých prípadoch aj geneticky interpretovať. Postupy elektroforetickej identifikácie, diferenciacie a charakterizácie genotypov rastlín pri niektorých rastlinných druhoch - pšenica, jačmeň, kukurica, ovos, fazuľa, pomocou zásobných bielkovín semena pokročili do takého stavu, že boli už akceptované i medzinárodnými organizáciami zaoberajúcimi sa ochranou autorských práv k odrodám (UPOV-Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Vegetables) a semenárskym testovaním (ISTA - International Seed Testing Association) (Draper, 1987).

Gliadíny zrna pšenice sú jednou z hlavných zložiek gluténových bielkovín. Vyznačujú sa vysokou dedivosťou a špecifickosťou. Elektroforetické profily gliadínov sa vplyvom podmienok pestovania nemenia, preto je možné na ich základe presne identifikovať a diferencovať jednotlivé odrody a línie pšenice. Skupina spoločne viazaných a dedených gliadínových zložiek sa označuje ako gliadínový blok. Medzi jednotlivými zložkami gliadínového bloku zvyčajne nedochádza k rekombináciám, teda medzi gliadínovými génmi riadiacimi biosyntézu gliadínových zložiek, nedochádza k procesu crossing-overu. Tieto gliadínové gény sa nachádzajú vo väzbe s niektorými génmi podmieňujúcimi hospodársky významné vlastnosti ako je napr. kvalita múky, mrazuvzdornosť, odolnosť proti hrdzi trávovej. Tento poznatok umožňuje využiť gliadíny ako markery daných vlastností v procese šľachtenia nových odrôd pšenice a pri určovaní homozygotnosti resp. heterozygotnosti hybridov (Černý a Šašek, 1995, 1996).

Vysokomolárne glutenínové podjednotky (HMW-GS) sú svojim podielom na celkových zásobných bielkovinách síce malou skupinou, ale svojou funkčnou dôležitosťou však mimoriadne významnou skupinou bielkovín. HMW-GS sú významné z hľadiska ich vzťahu k chlebopekárskej kvalite múky. Sledovaním vzťahu jednotlivých HMW-GS a chlebopekárskej kvality pšenice bolo zistené, že existuje medzi nimi súvislosť. Zásadný vplyv na kvalitu múky má aj kvalitatívne zastúpenie jednotlivých HMW-GS a ich vzájomné kombinácie. Zastúpenie jednotlivých HMW-GS a ich kombinácií v genotypoch pšeníc je

rozmanité. Aj napriek tomu, že v súčasnosti pestované odrody obsahujú predovšetkým podjednotky, ktoré kladne vplyvajú na kvalitu zrna pšenice, existujú niekedy rozdiely v zastúpení HMW-GS u pšeníc v rámci jednotlivých štátov. Tieto rozdiely sú podmienené šľachtením pšenice ako aj samotnou technologickou kvalitou zrna pšenice.

V dôsledku rôzneho vplyvu špecifických HMW-GS na pekársku kvalitu boli vypracované viaceré kritériá bodového hodnotenia jednotlivých lokusov. Medzi najrozšírenejšie patrí hodnotenie podľa Payneho (1983). Na základe rôzneho vplyvu špecifických HMW-GS na pekársku kvalitu boli vypracované viaceré kritériá bodového hodnotenia jednotlivých lokusov. Medzi najrozšírenejšie patrí hodnotenie podľa Payneho (1987). Na základe rôzneho vplyvu špecifických HMW-GS glutenínových podjednotiek na technologickú kvalitu zostavil Payne poradie subjednotiek podľa toho ako ovplyvňujú pekársku kvalitu a vyjadril tento vzťah bodovým hodnotením tzv. Glu-skóre resp., Glu-hodnotením Preukazný vzťah medzi Glu-skóre a technologickou kvalitou bol stanovený pri vybraných odrodách pšenice pestovaných v rôznych agroklimatických podmienkach sveta ako napr. v Austrálii (Gianibelli, 2002).

MATERIÁL A METODIKA

V našej práci bola použitá extrakcia a separácia zásobných bielkovín zrna pšenice letnej formy ozimnej.

Zásobné bielkoviny sme izolovali z endospermu celých, suchých, zreých zŕn. Z každej odrody sme analyzovali 20 zŕn. Zrno sme odvážili, zhomogenizovali mechanicky – rozmliaždením, vložili do Eppendorfovej skúmavky a uskutočnili extrakciu bielkovín.

Extrakciu glutenínov sme realizovali podľa štandardnej referenčnej metódy ISTA (Wrigley, 1992). Extrakcia glutenínov prebiehala 1 hodinu pri 25 °C za stáleho trepania v trepačke. Pred nanesením do gélu sme vzorku zdenaturovali vo vodnom kúpeli pri teplote 100 °C počas 10 minút. Po inkubácii sme vzorky vybrali z vodného kúpeľa, vychladili a nakoniec ich odstredili v odstredivke pri 12000 otáčkach za minútu po dobu 10 minút.

Extrakciu gliadínov sme uskutočnili podľa štandardnej referenčnej metódy ISTA v kyslom prostredí (Draper, 1987). roztoku. Vzorky sme premiešali a nechali extrahovať cez noc pri laboratórnej teplote. Pred nanesením vzorky do gélu sme extrakt odstredili v odstredivke pri 12000 otáčkach za minútu počas 10 minút.

Zásobné bielkoviny zrna pšenice letnej sme separovali pomocou SDS-PAGE a A-PAGE. Deliacim systémom pri separácii glutenínov bola diskontinuálna PAGE podľa metodiky ISTA (Wrigley, 1992). Pre elektroforetickú separačnú jednotku Protean II (Bio-Rad). Vyextrahované bielkoviny sme naniesli do gélu v množstve 5 µl na jednu aplikačnú dráhu gélu. Elektroforetické delenie prebiehalo pri veľkosti prúdu 30 mA, 6-10 hodín, pri konštantnej teplote 10 °C, až pokiaľ marker nedosiahol spodný okraj gélu. Prvých 15 minút sme nechali prebiehať delenie pri veľkosti prúdu 5 mA, ďalších 25 minút pri 10 mA a zvyšný čas pri veľkosti prúdu 30 mA.

Štandardná referenčná metóda schválená medzinárodnou organizáciou (ISTA, Draper 1987) využíva pri elektroforetickom delení gliadínov elektrolyt, ktorý je pripravený zmiešaním glycínu a kyseliny octovej s hodnotou pH 3,2. Separáciu gliadínov sme uskutočnili v kontinuálnych polyakrylamidových géloch v kyslom prostredí s pH 3,2 (Draper, 1987). Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 500 V počas trojnásobku behu markera Pyronínu G, pri teplote 3°C v elektroforetickej jednotke SE 600 (Hoefer Pharmacia Biotech).

Všetky frakcie zásobných bielkovín separované v SDS-PAGE a A-PAGE sme zafarbili v roztoku pripravenom zmiešaním 95 ml 10% kyseliny trichlóroctovej a 5 ml 0,5% roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 v etanole.

Genetická interpretácia alelickej zostavy v lokusoch Glu-1A, Glu-1B a Glu-1D a následný výpočet Glu-hodnotenia sme uskutočnili podľa katalógu alel pre vysokomolekulové glutenínové podjednotky (Payne et. al., 1983). Alelická zostava gliadínov bola určená podľa katalógu Černý – Šašek (1995).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V nadväznosti na uvedené, v našej práci sme sa orientovali na detekciu individuálnych HMW glutenínových podjednotiek a identifikáciu sekalínového bloku, pričom sme sledovali variabilitu elektroforetického spektra jednotlivých vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek a sekalínového bloku vo vzťahu k technologickej kvalite zrna pšenice v kolekcii 45 genotypov pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.)

Analyzovali sme genotypy pšenice získané z Poľnohospodárskeho družstva Sokolce, Hordeum Sládkovičovo a. s., UKSUPu Bratislava a PD Dvory nad Žitavou z úrody roku 2003. Získané výsledky sú zaznamenané v tabuľke 1, 2, 3 a 4.

Tab. 1 Zastúpenie HMW-GS v analyzovaných materiáloch z PD Sokolce

	Názov	HMW-GS			GLU-SKÓRE	SEKALÍNOVÝ BLOK	RAŽNÉ SKÓRE
		GLU-A1	GLU-B1	GLU-D1			
Pšenica letná	APACHE	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	ARIDA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	ARMELIS	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	BETTY	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	BREA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	FAVORIT	1	7+9	5+10	9	NIE	-
	MAGVAS	1	7+9	5+10	9	NIE	-
	MATADOR	0	7+9	5+10	7	ÁNO	5
	NIAGARA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	PETRANA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	PETUR	0	6+8	5+10	6	NIE	-
	RÁBA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	ZERDA	0	7+9	5+10	7	NIE	-

Tab. 2 Zastúpenie HMW-GS v analyzovaných materiáloch z Hordeum Sládkovičovo

	Názov	HMW-GS			GLU-SKÓRE	SEKALÍNOVÝ BLOK	RAŽNÉ SKÓRE
		GLU-A1	GLU-B1	GLU-D1			
Pšenica letná	KOŠŮTKA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	LÍVIA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	SANA	0	7+9	2+12	5	ÁNO	3
	PETRANA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	BONITA	0	7+9	5+10	7	ÁNO	5
	SK 47	0	7+9	2+12	5	ÁNO	3
	SK 53	0	7+9	5+10	7	ÁNO	5
	SK 60	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	SK 69	0	7+8	2+12	6	ÁNO	4
	SK 75	0	7+9	5+10	9	ÁNO	7
	SK 76	1	7+9	5+10	9	NIE	-
	SK 77	0	7+9	5+10	7	ÁNO	5
	SK 81	0	6+8	2+12	4	NIE	-
	SK 87	0	7+9	5+10	7	ÁNO	5
	SK 95	0	7+9	5+10	7	NIE	-

Tab. 3 Zastúpenie HMW-GS v analyzovaných materiáloch z UKSUP Bratislava

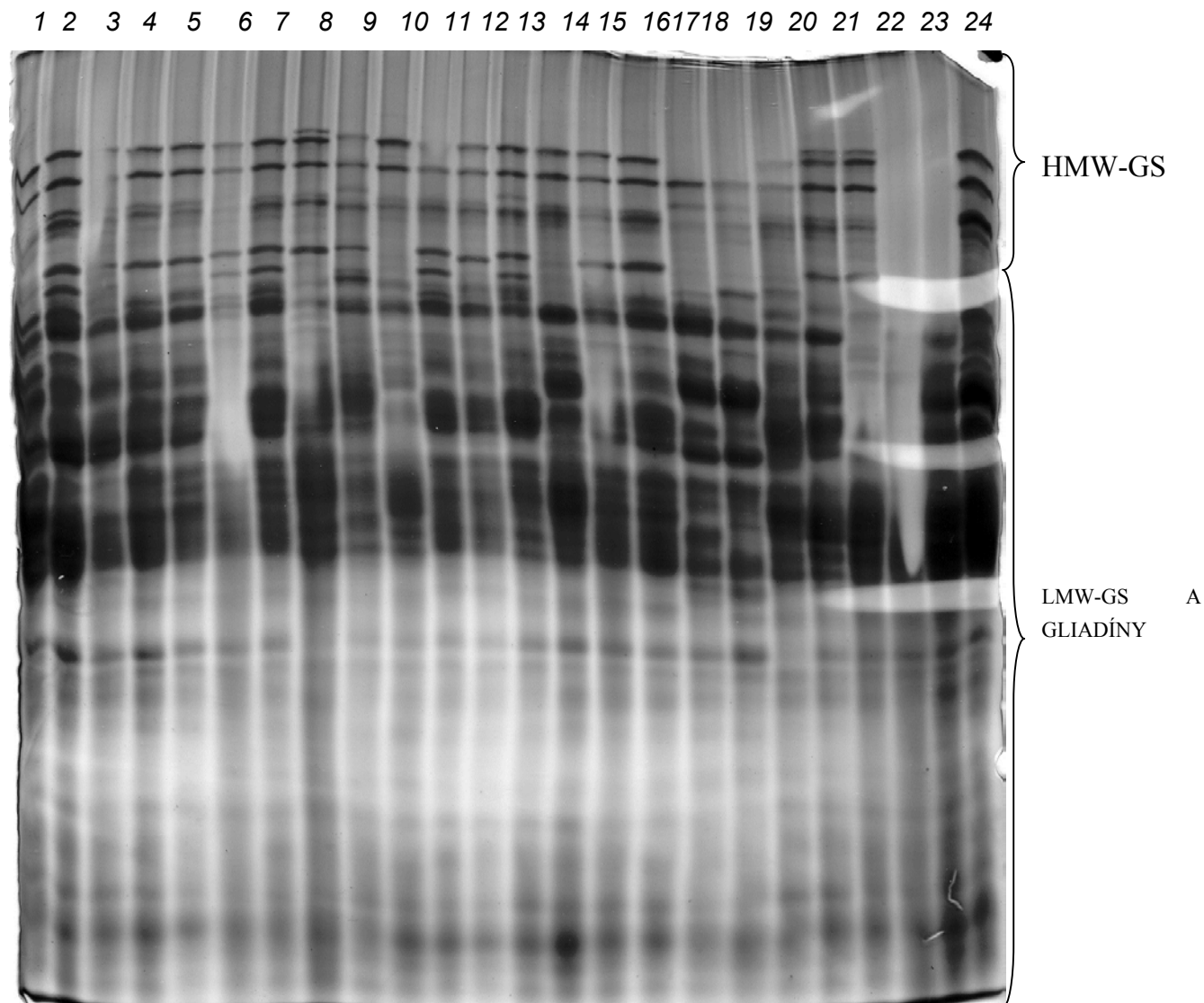
	Názov	HMW-GS			GLU-SKÓRE	SEKALÍNOVÝ BLOK	RAŽNÉ SKÓRE
		GLU-A1	GLU-B1	GLU-D1			
Pšenica letná	ARMELIS	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	ASTELA	2*	7+9	5+10	9	NIE	-
	SANA	0	7+9	2+12	5	ÁNO	3
	RADA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	ZERDA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	KLEA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	ILAVA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	EVA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	CHARGER	0	20	2+12	4	NIE	-
	KOŠŮTKA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	VIGINTA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	BONITA	0	7+9	5+10	7	ÁNO	5
	ARIDA	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	LIVIA	0	7+9	5+10	7	ÁNO	5
	HANA	0	7+8	5+10	8	NIE	-

Tab. 4 Zastúpenie HMW-GS v analyzovaných materiáloch z PD Dvory nad Žitavou

	Názov	HMW-GS			GLU-SKÓRE	SEKALÍNOVÝ BLOK	RAŽNÉ SKÓRE
		GLU-A1	GLU-B1	GLU-D1			
Pšenica letná	APACHE	0	7+9	5+10	7	NIE	-
	NIAGARA	0	7+9	5+10	7	NIE	-

Elektroforetické spektrá zásobných bielkovín týchto odrôd sú uvedené na obrázkoch 1 (SDS-PAGE) a 2 (A-PAGE).

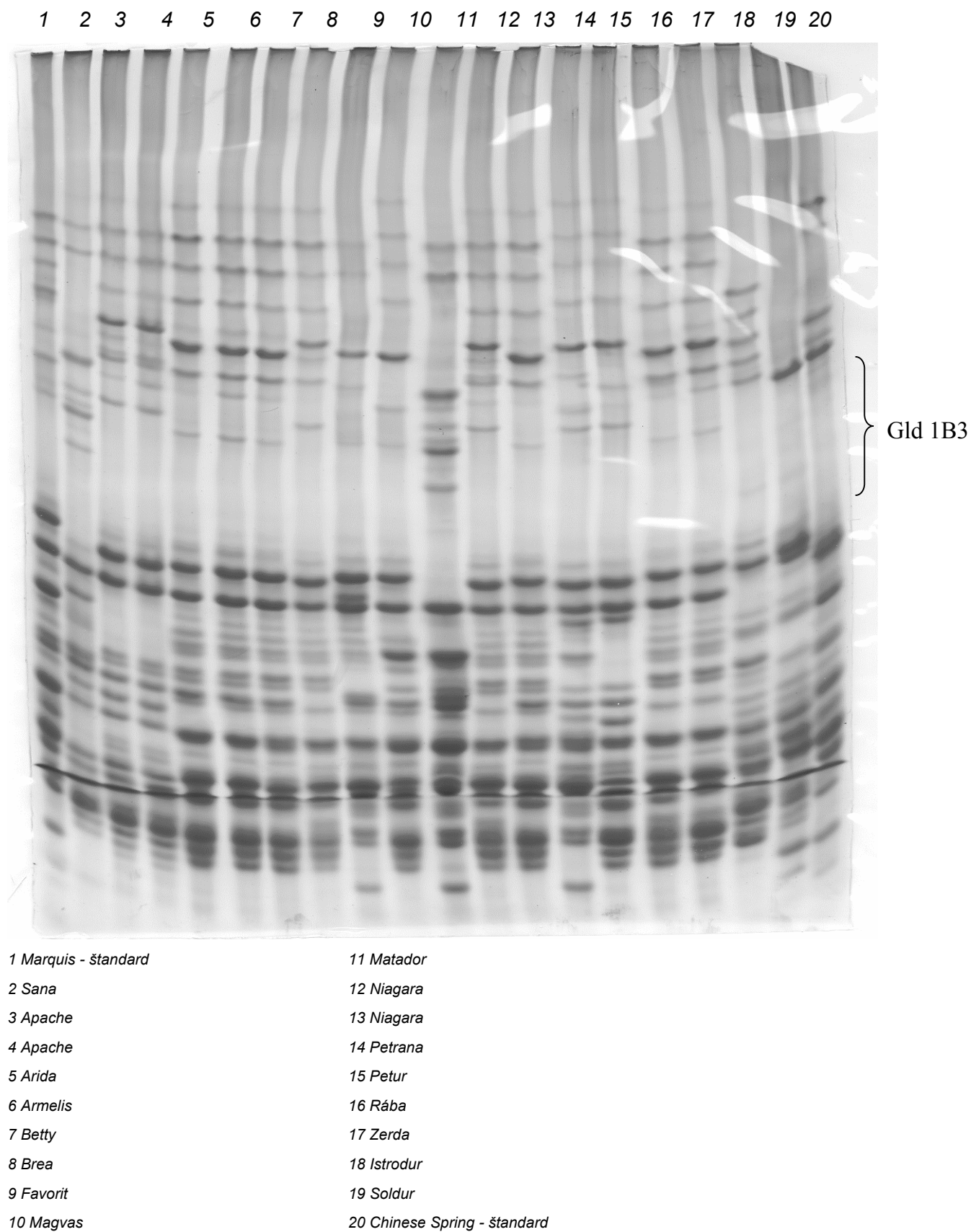
Obr. 1 Elektroforetické profily zásobných bielkovín zrna analyzovaných materiálov



1 Apache
2 Apache
3 Arida
4 Armelis
5 Betty
6 Brea
7 Matador
8 Favorit
9 Sana
10 Niagara
11 Niagara
12 Rába

13 Petrana
14 Zerda
15 Bonita
16 Livia
17 Soldur
18 Istrodur
19 Košútka
20 Magvas
21 Marquis-štandard
22 Petrana
23 Petur
24 Chinese Spring-štandard

Obr. 2 Elektroforetické profily zásobných bielkovín zrna analyzovaných materiálov



Z dosiahnutých výsledkov vyplýva (Tabuľka 1,2,3 a 4), že analyzované genotypy pšenice letnej formy ozimnej sú homogénne jednolíniové, pričom bolo zistených 9 elektroforetických profilov v pšenici letnej. Majoritný podiel (78%) z analyzovaných genotypov pšenice letnej predstavovali HMW-GS s komponentnou skladbou 0, 7+9, 5+10, kým minoritný podiel (9% genotypov) sa vyznačoval skladbou HMW-GS 1, 7+9, 5+10 resp. (7% genotypov) frakčnou skladbou HMW-GS 0, 7+9, 2+12. Uvedené je v súlade aj s výsledkami zistenými inými autormi ako Gregová et al. (1995), Gálova et al. (2002), Kraic et al. (1999) a ďalšími.

Z výsledkov ďalej vyplýva, že z génov kódovaných lokusom Glu-A1 sa najčastejšie vyskytovala nulová alela (89% genotypov), lokus Glu-B1 bol reprezentovaný najčastejšie HMW - gluténovými subjednotkami 7+9 (88% genotypov) a najfrekventovanejšou podjednotkou kódovanou lokusom Glu-D1 bola subjednotka 5+10 identifikovaná v 39 genotypoch (87%).

Zo zastúpenia jednotlivých HMW gluteninových podjednotiek možno predigovať technologickú kvalitu zrna pšenice vypočítaním Glu-hodnotenia (Payne et al. 1987). V tomto smere najvyššie bodové Glu-hodnotenie (9) dosiahli odrody Magvas, Favorit, Astela a SK 76, kým najnižšie hodnoty (4) dosiahli genotypy SK 81 a Charger Cl.

Z analyzovaných materiálov vyplýva (Tabuľky 1, 2, 3 a 4), že sekalínový blok Gld 1B3 bol detegovaný v gliadínových spektrách 12 hodnotených genotypov, čo má za následok zníženie Glu-hodnotenia o dva body. Z uvedeného vyplýva, že dané genotypy sa vyznačujú nízkou technologickou kvalitou avšak dobrou odolnosťou voči hrdzi trávovej

ZÁVER

Z elektroforetických profilov jednotlivých pšeníc možno urobiť nasledovné závery:

1. V súbore analyzovaných hexaploidných pšeníc bola zistená relatívne vysoká variabilita alel lokusu Glu-1 a následne bielkovín nimi kódovaných. Identifikovaných bolo spolu 9 rôznych vysokomolekulových glutenínových alel.
2. V súbore analyzovaných genotypov pšenice letnej boli najfrekventovanejšími HMW-GS alelami, v jednotlivých Glu-1 lokusoch alely 0 (Glu-A1), 7+9 (Glu-B1) a 5+10 (Glu-D1) s podielom 91%, 90% resp. 87%. Najvyšiu hodnotu Glu-skóre (9) dosiahli odrody Magvas, Favorit, Astela a SK 76. Priemerná hodnota Glu-skóre bola 7.
3. Analýzou gliadínových spektier pšenice letnej bol identifikovaný gliadínový blok 1B3, marker nevyhovujúcej technologickej kvality, v 12 analyzovaných genotypoch.
4. Z kolekcie 45 analyzovaných genotypov pšenice letnej na základe Glu -hodnotenia (>7) a Ražného skóre (>7) môžeme 32 genotypov charakterizovať ako pšenice s veľmi dobrou technologickou kvalitou.
5. Metodiky ISTA SDS-PAGE a A-PAGE sú vhodné na identifikáciu a diferenciaciu genotypov pšenice na základe prítomnosti HMW-GS a gliadínových blokov.

LITERATURA

ČERNÝ, J. – ŠAŠEK, A. – VEJL, P. – HANIŠOVÁ, A. (1995): Common wheat (*T. aestivum* L.) marking by determination of approximate dependence of frequency of allelic gliadin genes on quality grade of agronomic character. *Scientia Agriculturae Bohemica*, roč. 26, 1995 č. 4: 245 – 258.

ČERNÝ, J. – ŠASEK, A. (1996): Elektroforetická analýza gliadínov s vysokou molekulovou hmotnosťou odrôd pšenice (*Triticum aestivum* L.) testovaných v štátnych odrodových pokusoch v Rakúsku. *Scientia Agriculture bohemia*, roč. 27, 1996, č. 4: 237 – 260.

DRAPER, S. R. (1987): ISTA variety committee. Report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986. *Seed Sci. Technol.*, roč. 15, 1987: 431 – 434.

GÁLOVÁ, Z. – MICHALÍK, I. – KNOBLOCHOVÁ, H. – GREGOVÁ, E. (2002): Variation in HMW glutenin subunits of different species of wheat. *Rostlinná výroba*, 44, 2002: 111-116.

Gianibelli, M. C. (2002): Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Endosperm Proteins. *Cereal Chem.* 78(6):635-646.

GREGOVÁ, E. – KRAIC, J. – ŽÁK, I. (1995): Charakterizácia odrôd pšenice pomocou glutenínov. *Biochemické, molekulárne a morfológické techniky v identifikácii odrôd rastlín*. Bratislava: ÚKSUP, 1995: 11 – 14.

KRAIC, J. (1999): Molekulárna deferenciácia a charakterizácia genotypov rastlín: Doktoranská dizertačná práca. Piešťany: VÚRV, 1999: 109 s.

PAYNE, P. I. – NIGHTINGALE, M. A. – KRATTIGER, A. F. (1983): The relationship between the HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *Cereal Research Communications*, roč. 11, 1983, č. 6: 29 – 35.

WRIGLEY, C. W. (1992): Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. Linskens, H. F. – Jackson, J. F.: *Seed Analysis*, Berlin, Heilderberg, Springer-Verlag, 1992: 17 – 41.