

NPPC-VÚRV Piešťany
2015



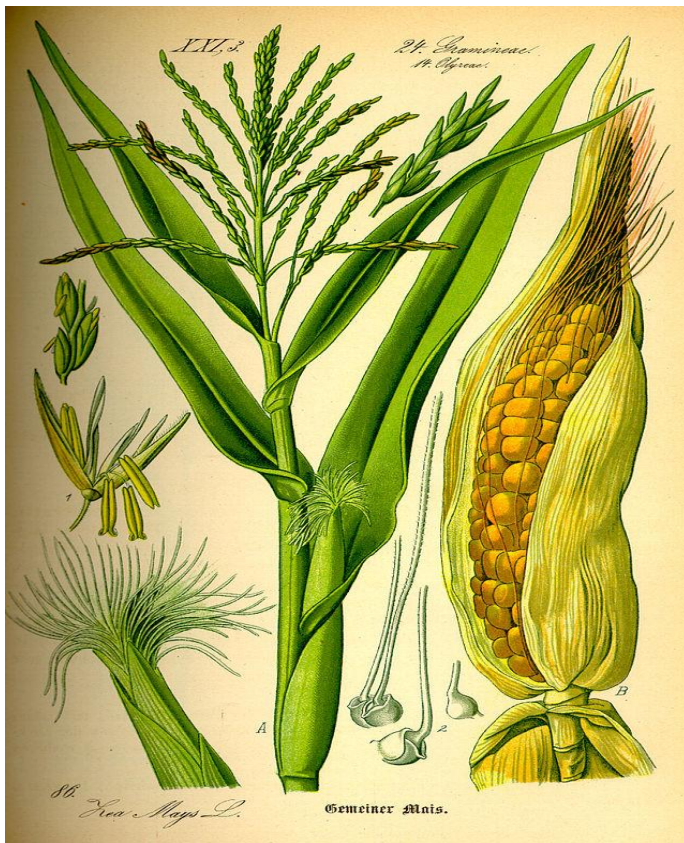
Analýza zeínov kukurici siatej a kukurici cukrovej elektroforetickými metódami



Agentúra
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ



Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Prenos efektívnych postupov selekcie a identifikácie rastlín do šľachtenia ITMS: 26220220142, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



Ing. Edita Gregová, PhD., Ing. Pavol Hauptvogel, PhD.

NPPC-VÚRV Piešťany

Bratislavská cesta 122

921 68 Piešťany

Ing. Szilárd Kása, PhD.

Zelseed, 930 36 Horná Potôň

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Materiál a metódy.....	12
2.1 Extrakcia zásobných semenných bielkovín.....	13
2.1.1 Extrakcia glutenínov pre SDS-PAGE.....	13
2.1.2 Elektroforetické separácie bielkovín v SDS-PAGE..	14
2.1.3 Extrakcia glutenínov pre A-PAGE.....	15
2.1.4 Elektroforetické separácie bielkovín v A-PAGE.....	16
2.2. Farbenie bielkovín.....	17
3. Vyhodnotenie polymorfných bielkovinových fragmentov fingerprintov.....	18
3.1. Dendrogram 40 líní kukurice siatej.....	19
3.2 Dendrogram 15 líní kukurici cukrovej.....	21
3.3 Dendrogram 54 líní kukurice siatej.....	23
4. Použitá literatúra.....	25

1. Úvod

Jednou zo základných zložiek všetkých živých organizmov, teda aj rastlín sú bielkoviny. V rastlinnom organizme sa bielkoviny vyskytujú v každej bunke a sú zastúpené molekulami rôznej veľkosti, vlastností a funkcie. Bielkoviny v bunke plnia funkciu štruktúrnu a regulačnú. Rastlina obsahuje desiatky tisícok rôznych typov molekúl bielkovín. Tento bielkovinový polymorfizmus je použiteľným pre najrôznejšie účely, je tiež vhodným prostriedkom pre stanovenie identity individua a jeho odlišenie od ostatných.

Medzi základné typy bielkovín v rastline, okrem bielkovín s enzymatickou aktivitou a funkciou (enzýmov) patria bielkoviny zásobné. Sú evolučne mladším typom bielkovín a sú vhodné pre genetické markerovanie rastlín. Sú uložené v špecializovaných orgánoch a pletivách rastliny. Jednotlivé genotypy (odrody, hybridy, populácie) poľnohospodárskych plodín sa vzájomne čiastočne líšia niektorými morfológickými a agronomickými znakmi a vlastnosťami.

Kukurica siata (*Zea mays* [ssp. mays](#)) je kultúrna plodina z čeľade lipnicovité (*Poaceae*). Pôvodne ju domestikovali Indiáni na území dnešného Mexika. Kukurica je veľmi stará

rastlina. Spôsob jej domestikácie je jednou z najväčších záhad genetiky. Predpokladá sa, že kukurica vznikla vývojom a selekciou z teosintu (skupina amerických tráv z rodu *Zea*), s ktorým si však dnes kultúrna kukurica nie je vzhľadovo príliš podobná. Na rozdiel od ostatných kultúrnych plodín nie sú známe žiadne medzistupne medzi divokým predchodcom kukurice a kultúrnou plodinou. Kukurica nie je schopná samostatnej existencie bez pomoci poľnohospodára. Záhadu ešte umocňuje fakt, že dávní obyvatelia Ameriky nemali na domestikáciu kukurice príliš veľa času. Súčasné teórie predpokladajú, že kukurica "vznikla" niekedy medzi rokmi 4000 – 3000 pred Kr. v údolí rieky Balsas. Vedú sa spory o tom, či išlo o postupný proces alebo o šťastnú udalosť. S niektorými druhmi teosintu sa môže kukurica krížiť, kríženci majú väčšinou zníženú životaschopnosť. Napriek tomu sa predpokladá, že v Strednej Amerike dochádza k prenosu génov medzi populáciami teosintu a kukurice. Do Európy sa dostala po príchode Španielov do Ameriky. Kukurica je jednoročná tráva. Dorastá do výšky 1 až 3 metrov, u nás až 3 m. Má plné steblo. Vyrastajú z neho dlhé listy striedavo, v dvoch zvislých radoch. Skoré

odrody majú na hlavnom stebľe 8 – 12 listov, neskoré 24 a viac. Čepeľ listu má výrazné stredné rebro, je podlhovasto kopijovitá.

Kukurica je rastlina jednodomá a jednopohlavná.

Má haploidný počet chromozómov $n=10$.

Zrno kukurice obsahuje:

škrob (60 – 80%)

bielkoviny (6 – 22%)

tuk (1,5 – 15%)

celulózu (2 – 11%)

a popol (1,5 – 4%).

Niektoré odrody majú zrno obsahujúce až 15% jemného jedlého oleja, iné zas až 25% bielkovín.

Kukurica je modelová rastlina v genetike. Vo veľkej miere sa u nej využíva heteróza (zvýšenie kvality hybridov oproti pôvodným formám) – hybridy F1 generácie vytvorené krížením inbredných línií sú oproti odrodám úrodnejšie až o 30%.

Pri kukurici pestovanej na zrno je dôležitou charakteristikou zloženie endospermu. Na základe tejto charakteristiky sa rozlišuje päť rôznych typov (konvariet) kukurice:

- Pukancová (reventador, popcorn) - pôvodný domestikovaný variant. Má malé zrná s mäkkým škrobovým jadrom a veľmi tvrdým

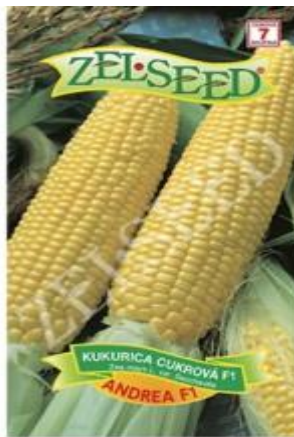
plášťom. Pri zahrievaní sa voda uzatvorená v jadre premení v paru a tá plášť nakoniec roztrhne. Táto kukurica tvorí cca 1% pestovanej rozlohy.



- Tvrdá alebo obyčajná (duro, flint) – podobná Pop kukurici ale s väčšou veľkosťou zrna. Táto kukurica sa pestuje najmä v horských podmienkach a v oblastiach, kde je potrebná odolnosť k chladu. Dobre znáša zlé skladovacie podmienky. Tvorí asi 14% rozlohy.
- Škrobnatá (blando) – kukurica na múku. Má mäkké škrobové jadro a ľahko sa melie. Používa sa na prípravu tortíl a podobne. Je to najbežnejšia

kukurica pre priamu ľudskú spotrebu. Tvorí asi 12% rozlohy.

- Konský zub (dentado) – jadro je tvorené väčším škrobovým endospermom ktorý je čiastočne zakrytý trochu tvrdšou šupkou. Tá však nepokrýva celé jadro, to preto pri schnutí vytvorí charakteristickú vyduť. Najrozšírenejší typ kukurice, predstavuje zhruba 73 % svetovej produkcie. Používa sa prevažne ako krmivo pre dobytok a v priemysle na výrobu škrobu, alkoholu, oleja a podobne.
- Cukrová – endosperm sa skladá prevažne z rozpustných cukrov s malým podielom škrobu. Predstavuje síce zanedbateľnú časť produkcie čo sa týka rozlohy, ale zato sa predáva za veľmi vysokú cenu ako zelenina na vyspelých trhoch.



Kukurica je cudzopelivá rastlina. Pri ich tvorbe šľachtitelia využili rôzne šľachtiteľské metódy. Pri kukurici sa pestujú F1 hybridy pre využitie heterózneho efektu, ktorý dosahuje až o 25-30% vyššiu úrodu oproti najvýkonnejšiemu rodičovskému partnerovi. Je známe, že takto získané hybridy sa vyznačujú vyššou úrodou, lepšou technologickou a nutričnou kvalitou. V semenárskych podnikoch sa pestujú medziodrodové, medzilíniové a odrodolíniové hybridy. Východiskový materiál kukurice siatej tvoria všetky jej druhy a poddruhy, krajové odrody, šľachtené odrody, populácie, hybridy línie a mutanty (Boháč, 1990).

Kukurica sa stala i modelovou plodinou pre heterozné šľachtenie. Hlavnú genetickú bázu kukurice tvoria komponenty, línie najviac pestovaných hybridov v súčasnej praxi, napriek tomu, že je oveľa širší sortiment kmeňov a línii, ktoré sú k dispozícii..

Vyšľachtené genetické materiály by mali byť udržiavané, ale súčasne musia podliehať ďalšiemu vývoju. Kombinačným šľachtením je možné v jednotlivých genotypoch koncentrovanie komplexných už existujúcich vlastností a súčasne zavedenie nových znakov, ktoré sú k dispozícii.

Lepšie hybridy je možné vyšľachtiť vylepšovaním línií. K tomu je potrebné poznanie dostupných genetických rezerv.

Pri tvorbe genetického materiálu kukurice siatej môže byť efekt šľachtenia výrazný pri zachovaní genetickej čistoty a pozitívnym, cieleným riedením sa môže zlepšovať aj kombinačná schopnosť. Genetická variabilita šľachtiteľských programov v značnej miere závisí od možností a kreativity šľachtiteľov minulosti, súčasnosti a budúcnosti.

Usporiadanie šľachtiteľských materiálov podľa príbuznosti a vykazovanie rozdielov medzi nimi predstavuje dôležitú úlohu pri šľachtení kukurice a podmieňuje efektívnosť šľachtiteľského procesu. Úspech šľachtenia je podmienený zachovaním a obohatením genetickej variability.

Cieľom práce bolo určiť genetickú podobnosť medzi líniami a vybrať línie pre heterózne šľachtenie kukurice. Zásobné bielkoviny zrna kukurice môžu slúžiť ako genetické bielkovinové markery pre identifikáciu genotypov aj pre stanovenie ich homogenity, keďže sú geneticky determinované určitými lokusmi a sú polymorfné. V rastlinnom organizme sa bielkoviny vyskytujú v každej bunke a sú zastúpené molekulami rôznej veľkosti, vlastností a funkcie. Bielkoviny v bunke

plnia funkciu štruktúrálnu a regulačnú. Rastlina obsahuje desiatky tisícok rôznych typov molekúl bielkovín. Tento bielkovinový polymorfizmus je použiteľným pre najrôznejšie účely, je tiež vhodným prostriedkom pre stanovenie identity individua a jeho odlíšenie od ostatných.

2. Materiál a metódy

Hodnotenie a výpočet genetickej podobnosti celkovo 109 línií kukurice siatej (*Zea Mays* L.) ktoré boli vytvorené na šľachtiteľskej stanici Zelseed s.r.o Horná Potôň.

Pomocou polyakrylamidovej gélovej elektroforézy v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a v kyslom prostredí (A-PAGE) boli hodnotené prítomné zeínové fragmenty. Deliacim systémom bola diskontinuálna SDS-PAGE podľa ISTA (Wrigley, 1992) a A-PAGE (Draper, 1987).

V proteínových profiloch sme hodnotili polymorfné reprodukovateľné markery ako prítomné (1) alebo neprítomné (0). Získané údaje sme použili na výpočet Jaccardovho koeficientu genetickej podobnosti pre všetky párové kombinácie. Takto získanú maticu genetickej podobnosti sme použili na konštrukciu dendrogramu.

Výsledný dendrogram sme konštruovali hierarchickou klastrovou analýzou metódou UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) použitím modulu SPSS Professional Statistics v. 8.0.1..

2.1 Extrakcia zásobných semenných bielkovín

1. Zásobné semenné bielkoviny sme izolovali z endospermu celých, suchých, zreľých zŕn, alebo len z časti endospermu bez embrya. Homogenizáciu zŕn sme robili mechanicky, rozmliaždením. Pre analýzy elektroforetických profilov zásobných semenných bielkovín kukurice sme použili frakcie glutelínového typu (bielkoviny rozpustné v slabých kyselinách alebo zásadách) a frakcie zeínov rozpustných v alkohole.

2.1.1.1 Extrakcia zeínov pre SDS-PAGE

Extrakciu glutenínov sme robili podľa štandardnej metódy ISTA (Wrigley, 1992).

Zloženie zásobného roztoku pre extrakciu zeínov glutelínového typu :

- 12,5 ml 1mol.l^{-1} Tris-HCl, pH 6,8
- 20 ml glycerolu
- 24,1ml destilovanej vody
- 4 g SDS
- 20 mg Pyronín Y

Pred extrakciou bol pripravený vždy čerstvý extrakčný roztok zo zásobného roztoku zmiešaním zásobného extrakčného roztoku, 2-merkptoetanolu a destilovanej vody v pomere

17:3:40. Na 1 mg rozdrveného zrna sme pridali 8 μ l takto pripraveného extrakčného roztoku. Bielkoviny sme extrahovali 1hodinu pri 25°C, vzorky sme občas premiešali vortexom. Pred nanesením do gélu boli vzorky denaturované zohriatím na 96° C počas 5 minút.

2.1.1.2 Elektroforetické separácie bielkovín v SDS-PAGE

Deliacim systémom bola diskontinuálna SDS-PAGE podľa ISTA (Wrigley, 1992). Koncentrácia polyakrylamidu v deliacom géli bola 12,7%, v štartovacom géli 6%.

Zloženie deliaceho gélu :

- * 0,381 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8
- * 12,7% akrylamid
- * 0,168% N,N'- metylénbisakrylamid
- * 0,1% SDS
- * 0,0253% persíran amónny
- * 0,05% TEMED

Zloženie štartovacieho gélu (dlhý 1 – 2 cm) :

- * 0,1235 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8
- * 6% akrylamid
- * 0,1% N,N'- metylénbisakrylamid
- * 0,1% SDS
- * 3,7% persíran amónny
- * 0,1% TEMED

Zloženie elektródového roztoku :

- * 1,41% glycín
- * 0,3% TRIS-HCl
- * 0,1% SDS

Pre lepšie rozlišovanie vysokomolekulových podjednotiek v SDS-PAGE sme použili rovnakú metodiku, koncentrácia polyakrylamidu však bola znížená v separačnom géli na 10%, resp. 7% a v štartovacom géli na 3%.

Pred nanesením do gélu sme vzorky denaturovali počas 10 minút pri 100°C. Po ich ochladení a centrifugovaní pri 12 000 ot./min. sme ich naniesli do gélu v množstve 5 – 15 µl, v závislosti od hrúbky použitého gélu (od 0,75 do 1,5 cm). Pre elektroforetické separácie bielkovín v SDS-PAGE sme použili elektroforetickú jednotku Protean II (Bio-Rad). Elektroforetické delenie prebiehalo pri 30 mA, 8 – 10 hodín, pri konštantnej teplote 15°C, až pokiaľ marker doputoval ku spodnému okraju gélu.

2.1.1.1 Extrakcia zeínov pre A-PAGE

Pre extrakciu v alkohole rozpustných bielkovín - prolaminov, sme použili štandardnú referenčnú metódu ISTA v kyslom prostredí (A-PAGE) (Draper, 1987). Zloženie extrakčného roztoku :

- * 30 % 2-chlóretanolu
- * 0,05% Pyronín G alebo Methyl Green

Jednotlivé zrná sme mechanicky homogenizovali a hrubý homogenát sme preniesli do 1,5 - 2 ml Eppendorf túb. K jednému rozdrvenému zrnku kukurice (hmotnosť 50-100 mg) sme pridali 0,2 ml extrakčného roztoku. Obsah tuby sme dôkladne premiešali a nechali extrahovať cez noc pri laboratórnej teplote. Pred nanesením 10 - 20 μ l extraktu do gélu sme obsah túb centrifugovali 10 minút pri 12 000 ot./min. (Sigma B. Braun 3K-10)

2.1.1.2 Elektroforetické separácie bielkovín v A- PAGE

Štandardná referenčná metóda, ktorú schválila organizácia International Seed Testing Association (ISTA, Draper 1987) používa ako elektrolyt zmes glycínu a kyseliny octovej, s hodnotou pH 3,1. My sme separáciu prolamínov robili v kontinuálnych polyakrylamidových géloch v kyslom prostredí pri pH 3,1 podľa Dropera (1987).

Zloženie gélového tlmivého roztoku :

- * 2% ľadová kyselina octová
- * 0,1% glycín
- * pH 3,2

Príprava 100 ml separačného gélu :

- * 60 ml gélového tlmivého roztoku
- * 10 g akrylamidu
- * 0,4 g N,N'- metylénbisakrylamidu
- * 0,1 g kyseliny askorbovej
- * 0,005 g síranu železnatého
- * 6 g močoviny
- * doplniť gélovým tlmivým roztokom do 100 ml
- * pridať 0,2-0,3 ml 10% roztoku persíranu amónneho
- * 0,3 ml TEMED
- Zloženie elektródového tlmivého roztoku :
- * 0,4% ľadová kyselina octová
- * 0,04% glycín
- * pH 3,1

Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 200 V počas 30 minút, 600 V počas 3 hodín pri teplote 4°C v elektroforetickej jednotke SE660 (Hoefer Pharmacia Biotech).

2.2 Farbenie bielkovín

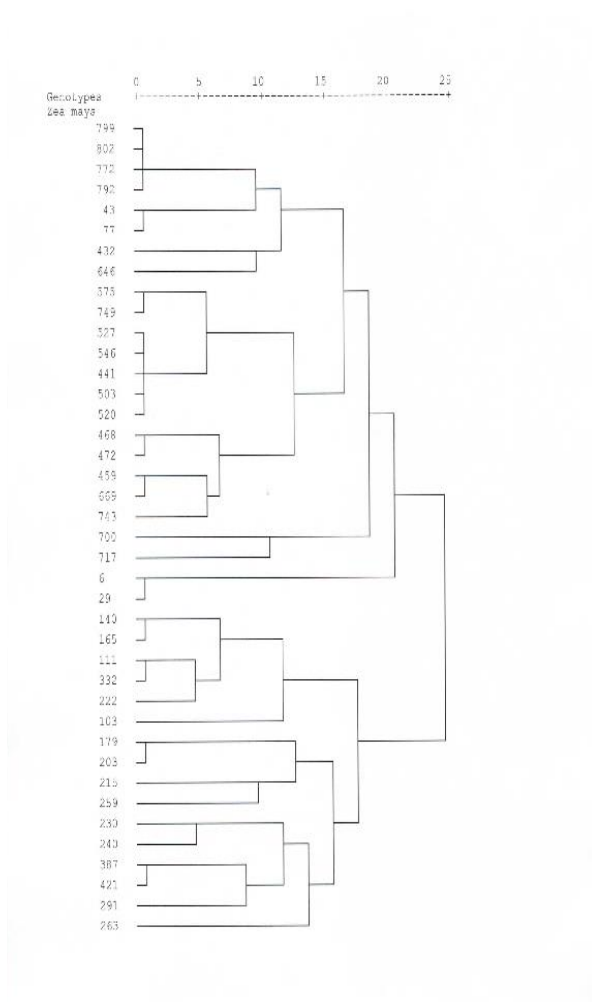
Všetky frakcie zásobných bielkovín separovaných v A-PAGE a SDS-PAGE sme farbili v roztoku pripravenom zmiešaním 95 ml 10% kyseliny trichlóroctovej a 5 ml 0,5% roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 v etanole. Farbili sme 10-15 minút. Prebytočné farbivo z gélu sme odstraňovali premývaním gélov vo vode.

3. Vyhodnotenie polymorfných bielkovinových fragmentov

Pomocou bielkovinových markerov –zeínov sme hodnotili prítomnosť alebo neprítomnosť fragmentov a na základe bielkovinových markerov sme zostrojili dendrogram, ktorý vyjadruje vzájomné genetické vzťahy (vzdialenosť príbuznosti) medzi sledovanými líniami. Zhlukovou analýzou UPGMA boli geneticky rozdielne línie rozdelené do hierarchických klastrov a bola vypočítaná genetická príbuznosť resp. rozdielnosť jednotlivých hybridných línii kukurice siatej a cukrovej.



3.1 Dendrogram zobrazujúci klastrovanie 40 línií kukurice siatej na základe ich genetickej vzdialenosti



Na základe vyhodnotenia 22 polymorfných znakov elektroforetickej separácie zeínov bolo možné využitím UPGMA algoritmu vytvoriť dendrogram, ktorý naznačuje genetické vzťahy medzi hybridných línií kukurice. 14 polymorfných znakov sme získali s metódou SDS-PAGE a 8 polymorfných znakov s metódou A-PAGE. Zhlukovou analýzou UPGMA boli geneticky rozdielne línie rozdelené do dvoch hlavných hierarchických klastrov, pričom v jednom klastri bolo zoskupených 16 línií a v druhom 24 línií kukurici siatej. Miera ich genetickej vzdialenosti podľa Jaccarda sa pohybovala v rozmedzí 0,0 – 0,88.

Nedali sa rozlíšiť línie (napr. 799, 802, 772 a 792). Rovnaký bielkovinový profil niektorých línií (napr. 527, 546, 441, 503, a 520) spôsobený pravdepodobne spoločným genetickým základom separovaných proteínov boli dôvodom prečo sa v zostrojenom dendrograme nepodarilo diferencovať.

V dendrograme sa vyskytlo ešte sedem dvojíc (43 a 77, 575 a 749, 468 a 472, 459 a 669, 6 a 29, 140 a 165, 111 a 332, 179 a 203, 387 a 421). Tieto línie kukurice siatej sa nedali odlíšiť a vykazovali tie isté fragmenty, to znamená, že sa nedajú využiť v rámci skupiny na kríženie na heterózný efekt.

Spektrum glutelínov obsahovalo bielkoviny s relatívnou molekulovou hmotnosťou od 97 kDa do 9 kDa a najväčšia variabilita bola v proteínoch s molekulovou hmotnosťou 20 až 30 kDa a 9 kDa. Vysoký stupeň polymorfizmu v tých oblastiach detekovali pomocou bielkovinových markerov výskumníci Pastorello et al. (2009).

Dokumentované klastrovanie analyzovaných hybridoch by malo súvisieť s rozdielmi v znakoch kódovaných lokusmi, z ktorých analyzované bielkovinové fragmenty pochádzajú.

3.2: Dendrogram zobrazujúci klastrovanie 15 línii kukurice siatej cukrovej na základe ich genetickej vzdialenosti



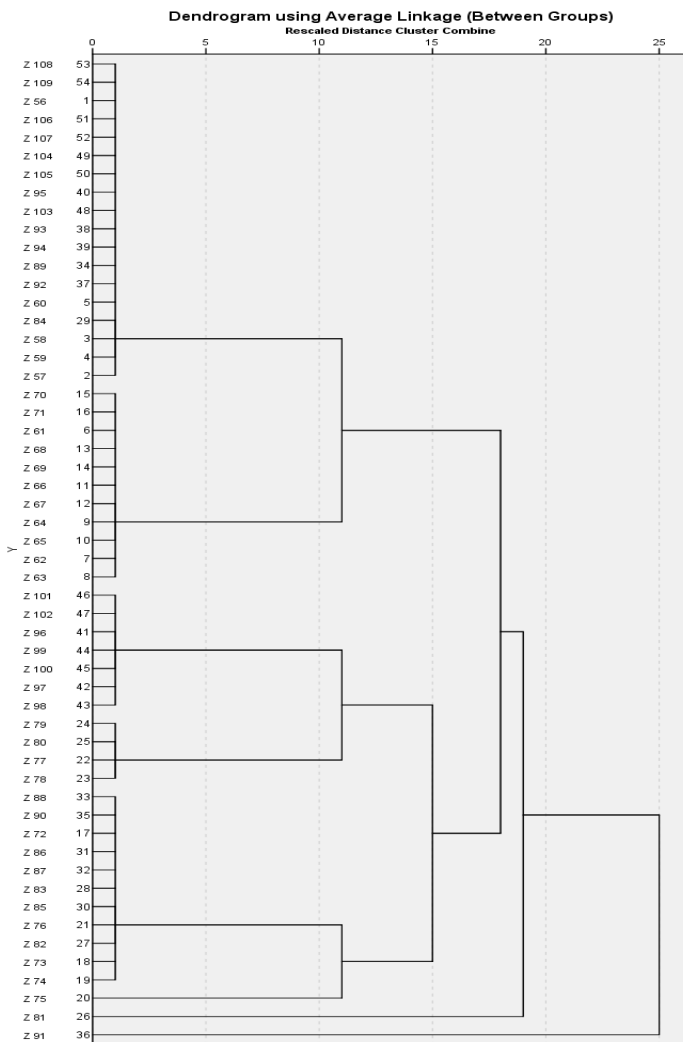
Na základe vyhodnotenia 13 polymorfných znakov elektroforetickej separácie zeínov bolo možné využitím UPGMA algoritmu vytvoriť dendrogram, ktorý naznačuje genetické vzťahy medzi hybridných línií kukurice. Bielkovinové markery sme získali s metódou A-PAGE.

Miera ich genetickej vzdialenosti podľa Jaccarda sa pohybovala v rozmedzí 0,0 – 1.

Zhlukovou analýzou UPGMA boli geneticky rozdielne línie rozdelené do dvoch hlavných hierarchických klastrov, pričom v jednom klastrí bolo zoskupených 4 línií a v druhom 11 línií.

Nedali sa rozlíšiť línie (napr. Z1947, Z2023 a Z2324) Rovnaký bielkovinový profil niektorých línií bol spôsobený pravdepodobne spoločným genetickým základom.

3.3 Dendrogram zobrazujúci klastrovanie 54 línií kukurice siatej na základe ich genetickej vzdialenosti



Na základe vyhodnotenia 5 polymorfných znakov elektroforetickej separácie zeínov bolo možné využitím UPGMA algoritmu vytvoriť dendrogram, ktorý naznačuje genetické vzťahy medzi hybridných línií kukurice satej. Zeínové fragmenty sme analyzovali s metódou SDS-PAGE. Zhlukovou analýzou UPGMA boli geneticky rozdielne línie rozdelené do dvoch hlavných hierarchických klastrov, pričom v jednom klastrí bolo 11 línií a v druhom 43 línií kukurici satej. V prvom klastrí je samostatne odlíšená hybridná línia Z91 a druhý klaster bol rozdelený do dvoch skupín: 52 hybridných línií a jedna samostatná línia Z81. Miera ich genetickej vzdialenosti podľa Jaccarda sa pohybovala v rozmedzí 0,0 – 1.

Zhodné zeínové fragmenty mala 18 členná skupina (56, 57, 58, 59, 60, 84, 89, 92, 93, 94, 95, 103, 104, 105, 106, 107, 108 a 109) spôsobené pravdepodobne spoločným genetickým základom. Druhá skupina bola 11 členná (72, 73, 74, 76, 82, 83, 85, 86, 87, 88 a 90). Tretia skupina bola 4 členná (77, 78, 79, 80).

Spektrum glutelínov obsahovalo bielkoviny s relatívnou molekulovou hmotnosťou od 97 kDa do 9 kDa a najväčšia variabilita bola v proteínoch s molekulovou hmotnosťou 20 až 30 kDa a 9 kDa.

3. Použitá literatúra

BOHÁČ, J. – ANDONOV, J. – ČERMÍN, L. – VLK, J. 1990. Šľachtenie rastlín. 1. vydanie Bratislava: Príroda, 535 s. ISBN 80-07-00231-6.

DRAPER, S.R., : ISTA variety committee. report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986. Seed Sci. Technol., 15, 1987, s. 431-434.

PASTORELLI, E. A. – FARIOLI, L. – PRAVETTONI, V. – SCIBILIA, J. – CONTI, A. – FORTUNATO, D. – BORGONOVO, L. – BONOMI, S. – PRIMAVESI, L. – BALLMER-WEBER, B. Maize food allergy: lipid-transfer protein, endochitinases and alpha-zein precursor are relevant maize allergens in double-blind placebo-controlled maize-challenge-positive patients. Anal. Bioanal. Chem., 359, 2009, s.93-102.

WRIGLEY, C. W. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. Heidelberg, Springer-Verlag, 1992, s. 17-41.

***Analýza zŕinov kukurici siatej a kukurici cukrovej
elektroforetickými metódami***

Autori: Ing. Edita Gregová, PhD., Ing. Pavol Hauptvogel, PhD.,
Ing Szilárd Kása, PhD.

Vydanie: prvé

Vydavateľ: NPPC-VÚRV Piešťany
Bratislavská cesta 122
921 68 Piešťany

Rok vydania: 2015

Počet strán : 24

Neprodajné/Určené pre vlastnú potrebu/

