

## BIAŁKA MARKEROWE ODMIAN *Festulolium* I JEGO GATUNKÓW RODZICIELSKICH

*Sławomir Bartkowiak, Magdalena Łuczak, Zbigniew Zwierzykowski*

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

### Wstęp

Metoda dwukierunkowej elektroforezy (2-DE) na żelu poliakrylamidowym umożliwia rozdzielanie na jednym żelu do kilkuset peptydów, dzięki czemu z jednego doświadczenia można uzyskać wiele informacji na temat stopnia pokrewieństwa i zróżnicowania genetycznego organizmów [KALINOWSKI i in. 1993; THIELLEMENT i in. 1999]. Celem niniejszej pracy było porównanie obrazów białek odmian *Festulolium*, pochodzących z mieszańca międzyrodzajowego *Festuca pratensis* HUDS. ( $2n = 4x = 28$ )  $\times$  *Lolium multiflorum* LAM. ( $2n = 4x = 28$ ) [ZWIERZYKOWSKI i in. 1993] z odmianami gatunków rodzicielskich poprzez wykorzystanie metody 2-DE. Białka były analizowane zarówno na poziomie diploidalnym (siewki), jak i haploidalnym (ziarna pyłku). W rozwoju zierem pyłku biorą udział geny sporofitu i gametofitu. Poza tym dojrzały pyłek jest dobrym obiektem badawczym, ponieważ ma ściśle określone stadium fizjologiczne, co ma istotne znaczenie w analizach porównawczych.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły dwie odmiany *Festulolium* – Felopa i Sulino oraz odmiany gatunków rodzicielskich: *F. pratensis* HUDS. Westa i *L. multiflorum* LAM. Mitos. Białka izolowano z 6-dniowych siewek oraz dojrzałych ziaren pyłku. Ze względu na brak dostatecznej ilości pyłku nie analizowano białek pyłku odmiany Felopa. Ekstrakcje przeprowadzono wg metody HURKMANA i TANAKI [1986] z fazą fenolową, przy czym białka mikrogametofitu dzielono dodatkowo na dwie frakcje. Pierwszą stanowiły białka eluowane z płaszczka pyłkowego (ang. pollen coat, pollen kit or tryphine; pod pojęciem płaszczka pyłkowego rozumie się związki zdeponowane na powierzchni i w zagłębieniach egzyny), a drugą peptydy izolowane z przemytych ziaren pyłku. W ten sposób w drugiej frakcji otrzymano białka powstałe głównie w wyniku ekspresji genów gametofitu. Wypłukiwanie białek z egzyny i tryfiny przeprowadzono za pomocą buforu Hurkmana.

Białka były rozdzielane metodą dwukierunkowej elektroforezy (2-DE) według procedury HOCHSTRASSERA i in. [1988]. Pierwszym kierunkiem elektroforezy było izoelektroogniskowanie (IEF), drugim – elektroforeza w żelu denaturującym

zawierającym detergent (1% siarczan dodecylsodowy – SDS). W pierwszym kierunku (IEF) stosowano kolumnienki żelu poliakryloamidowego (1 × 120 mm) zawierającego servalit o pH 3–10. Białko ogniskowano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin przy wzrastającym napięciu od 50–1000 V. Drugi kierunek prowadzono w 12% żelach poliakryloamidowych (1 × 120 × 100 mm) przy stałym natężeniu prądu 1 mA·mm<sup>-2</sup> żelu przez 4 godziny w temp. pokojowej. Rozdzielone peptydy wybarwiano metodą srebrową. Otrzymane obrazy proteomiczne analizowano przy pomocy programu Lab Scan i Image Master 2-D Elite.

## Wyniki i dyskusja

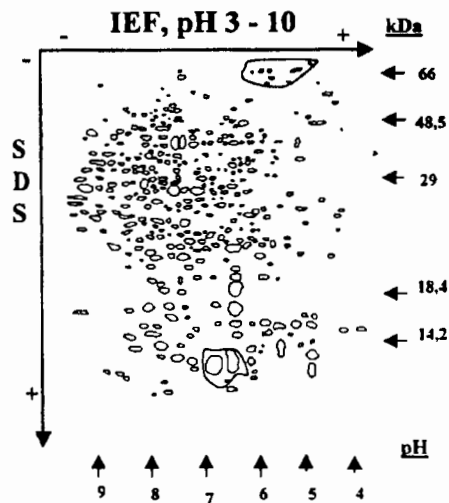
Peptydy obecne u odmian gatunków rodzicielskich były w większości obserwowane także u odmian *Festulolium*, wykryto też białka charakterystyczne tylko dla *Festulolium* i gatunków rodzicielskich zarówno na poziomie diploidalnym w siewkach, jak i haploidalnym – pyłku. Ponadto w siewkach obu odmian *Festulolium* stwierdzono występowanie grup białek, których nie wykryto u form rodzicielskich. Było to 7 białek o punktach izoelektrycznych (pI) w zakresie pH 8,4–9,4 i masach cząsteczkowych od 40 do 50 kDa i 2 białka o pI w zakresie pH 4,7–5,0 i masie poniżej 14,2 kDa (rys. 1). Podobnie analiza obrazów białek z dojrzałego pyłku ujawniła obecność peptydów niezidentyfikowanych u gatunków rodzicielskich. Charakterystyczne dla *Festulolium* odm. Sulino były białka o niskiej masie cząsteczkowej (poniżej 14 kDa), których punkty izoelektryczne znajdują się w pH 8,0–8,4 (2 białka), 8,7–9,3 (4 białka) i 3,8 (2 białka); 4 białka o pI w pH 8,0–8,7 i masach powyżej 66 kDa; 3 białka o pI w pH 8,7–9,0 i masach 24–26 kDa. W obrazach 2-DE białek płaszcza i ścian pyłkowych (tryfiny i egzyny) także zaobserwowano występowanie peptydów nieobecnych u form rodzicielskich. Wśród tych nowych białek charakterystyczne były dwie grupy: pierwsza to 5 białek, których punkty izoelektryczne odpowiadały pH 7,5–8,5, a ich masy cząsteczkowe wynosiły od 33 do 39 kDa, druga to 2 białka o pI 7,2–8,7 i masach poniżej 14,2 kDa.

Tabela 1; Table 1

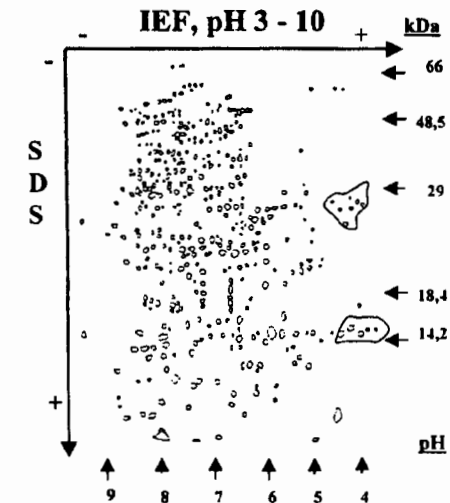
Liczba plam polipeptydów wykrytych w różnych tkankach *Festulolium* odmiany Sulino i gatunków rodzicielskich

Number of polypeptide spots in different tissues of *Festulolium* cv. Sulino and parental species

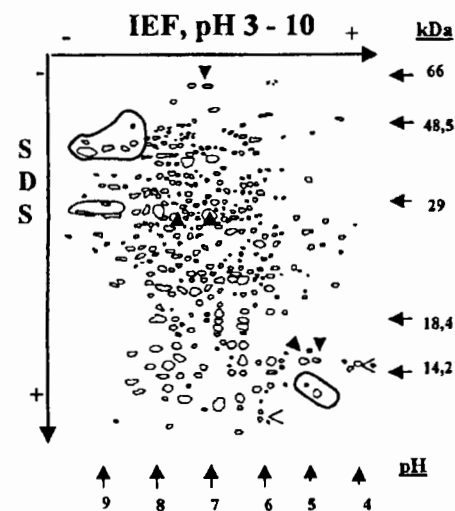
Materiał Material	<i>F. pratensis</i> odmiana; cultivar Westa	<i>L. multiflorum</i> odmiana; cultivar Mitos	<i>Festulolium</i> odmiana; cultivar Sulino
6-dniowe siewki 6-day old seedlings	361	406	226
Dojrzały pyłek Mature pollen grains	312	365	298
Płaszcz pyłkowy Pollen coat	311	212	164
Intyna i cytoplazma pyłku Pollen intine and cytoplasm	250	130	267



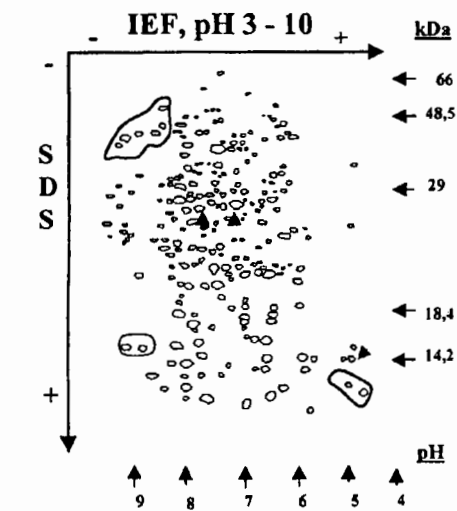
*F. pratensis* odmiana; cultivar Westa = 361 pep.



*L. multiflorum* odmiana; cultivar Mitos = 406 pep.



*Festulolium* odmiana; cultivar Felopa = 355 pep.



*Festulolium* odmiana; cultivar Sulino = 226 pep.

IEF – izoelektroogniskowanie; isoelectrofocusing  
 SDS – siarczan dodecylsodowy; dodecyl sodium sulfate

Rys. 1. Obrazy białek ogólnych z siewek po rozdziale metodą dwukierunkowej elektroforezy. Linia zaznaczono peptydy charakterystyczne dla odmian *Festulolium* i gatunków rodzicielskich. Strzałkami zaznaczono pochodzenie wybranych białek: ▶ mateczne, > ojcowski

Fig. 1. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) of proteins from seedlings. The line marked the peptides characteristic for cultivars of *Festulolium* and parental species. Origin of some parental proteins was marked with arrows: ▶ maternal, > paternal

Specyficzne peptydy wykryto także na obrazach elektroforetycznych białek pochodzących z głębszych, nieodmywalnych warstw pyłku (intyna i cytoplazma). Należą do nich między innymi 4 peptydy posiadające punkt izoelektryczny w pH 7,1–8,0 o masie 65 kDa, 2 peptydy o pI w zakresie pH 4,2 o masie poniżej 14,2 kDa, 2 peptydy o pI 4,4 i masie 23 i 26,4 kDa oraz 4 peptydy o pI w pH 4,6–5,0 i masach od 27 do 34 kDa. W gatunkach rodzicielskich wykryto również grupy białek specyficznych, które nie występowały u odmian *Festulolium*. W większości przypadków u odmian *Festulolium* stwierdzano przewagę białek *F. pratensis* oraz spadek ogólnej liczby peptydów w stosunku do obu gatunków rodzicielskich. Tylko w przypadku obrazów proteomicznych białek wewnętrznych pyłku zaobserwowano wzrost liczby białek u *Festulolium* odm. Sulino w stosunku do gatunków rodzicielskich (tab. 1). Porównując liczbę plam uzyskanych na obrazach białek pyłku nieodmytego do tych, które wykryto na żelach po odmyciu zewnętrznych partii pyłku można przypuszczać, iż tylko niewielka część białek izolowanych z pyłku nieodmytego jest pochodzenia sporofitowego.

Analizy porównawcze organizmów mogą być prowadzone na różnych poziomach organizacji. Rośliny mogą być porównywane na podstawie cech morfologicznych, anatomicznych, cytologicznych i biochemicznych. Porównania na poziomie molekularnym powszechnie wykonuje się za pomocą elektroforezy białek. Jedną z najczulszych i wysokorozdzielczych technik elektroforetycznych jest elektroforeza dwukierunkowa na żelu poliakrylamidowym. Obecnie jest to podstawowa metoda w proteomice, jednej z najintensywniej rozwijających się dziedzin biologii molekularnej [THIELLEMENT i in. 1999].

## Wnioski

1. Analiza obrazów zmienności białek odmian *Festulolium* i gatunków rodzicielskich wykazała istnienie wysokiego polimorfizmu białek (na żelach po rozdzielach 2-DE wykrywano po kilkaset peptydów).
2. Specyficzne grupy białek wykryte u mieszańców *Festulolium* i ich gatunków rodzicielskich mogą być wykorzystane jako markery molekularne.
3. Dojrzały pyłek okazał się dobrym materiałem do analizy polimorfizmu białkowego traw kompleksu *Lolium-Festuca*.
4. Otrzymane wyniki potwierdzają celowość wybrania metody 2-DE do analizowania polimorfizmu białek traw kompleksu *Lolium-Festuca*.

## Literatura

- HOCHSTRASSER D.F., HARRINGTON M.G., HOCHSTRASSER A., MILLER M.J., MERRIL C.R. 1988. *Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis*. Anal. Bioch. 173: 424–435.
- HURKMAN W.J., TANAKA CH.K. 1986. *Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis*. Plant Physiol. 81: 802–806.

- KALINOWSKI A., SIEDLEWSKA A., KRÓLIKOWSKI Z., BARTKOWIAK S. 1993. *Comparative study of soluble proteins in pollen grains and seedlings of hybrids and their inbred parents in maize*. Proc. XVIth Conf. EUCARPIA, Maize and Sorghum. Bergamo, (Włochy), 6–9 VI 1993: 350–357.
- THIELLEMENT H., BAHRMAN N., DAMERVAL C., PLOMION CH., ROSSIGNIOL M., SANTONI V., DE VIENNE D., ZIVY M. 1999. *Proteomics for genetic and physiological studies in plants*. Electrophoresis 20: 2013–2026.
- ZWIERZYKOWSKI Z., JOKŚ W., NAGANOWSKA B. 1993. *Mieszzańce amfitetraploidalne Festuca pratensis Huds. × Lolium multiflorum Lam. [= ×Festulolium braunii (K. Richter) A. Camus]*. Biul. IHAR 188: 61–69.

**Słowa kluczowe:** *Festulolium*, dwukierunkowa elektroforeza, białka

### Streszczenie

W pracy analizowano obrazy białka ogólnego siewek i pyłku poprzez zastosowanie metody dwukierunkowej elektroforezy na żelu poliakryloamidowym. Obiektem badań były dwie odmiany *Festulolium* – Felopa i Sulino oraz odmiany gatunków rodzicielskich: *Festuca pratensis* HUDS. Westa i *Lolium multiflorum* LAM. Mitos. Na otrzymanych obrazach zmienności białek wykryto po kilkaset peptydów, co świadczy o istnieniu wysokiego polimorfizmu białek u badanych traw. W siewkach *Festulolium* wykrywano mniej białek niż u gatunków wych. Specyficzne grupy białek mogą być wykorzystane jako markery molekularne. Dojrzały pyłek okazał się dobrym materiałem badawczym do analizy polimorfizmu białkowego.

### MARKER PROTEINS OF *Festulolium* CULTIVARS AND ITS PARENTAL SPECIES

Sławomir Bartkowiak, Magdalena Łuczak, Zbigniew Zwierzykowski  
Institute of Plant Genetics Polish Academy of Sciences, Poznań

**Key words:** *Festulolium*, two-dimensional electrophoresis, proteins

### Summary

*Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) was conducted on etiolated seedlings and mature pollen grains proteins from two Festulolium cultivars – Felopa and Sulino and its parental species: Festuca pratensis HUDS. cv. Westa and Lolium multiflorum LAM. cv. Mitos. In each case 2-D PAGE proteomic pictures of soluble proteins showed several hundred of poly-*

peptide spots. Generally, less number of spots were found in seedlings of *Festulium* cultivars than in the cultivars of parental species. Specific sets of proteins can be useful as the molecular markers. Mature pollen grains proved to be a convenient material for determination of protein polymorphism.

Doc. dr hab. Sławomir **Bartkowiak**  
Instytut Genetyki Roślin PAN  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 POZNAŃ  
e-mail: sbar@igr.poznan.pl