

UDK

KORIŠĆENJE PROTEINSKIH MARKERA ZA KARAKTERIZACIJU I UTVRĐIVANJE GENETIČKE ČISTOĆE SEMENA KUKURUZA

DRINIĆ MLADENVIĆ, SNEŽANA, KONSTANTINOV, KOSANA¹

IZVOD: Kontrola genetičke čistoće i identifikacija genotipa je od velikog značaja u svim fazama proizvodnje eksperimentalnih i komercijalnih hibrida i održavanju linija kukuruza. U radu su korišćeni proteini klice za genetičku karakterizaciju genotipova kukuruza kao i za utvrđivanje genetičke čistoće semena. Elektroforezom proteini klice su razdvojeni na veliki broj frakcija koje pokazuju visoku heterogenost. Svi ispitani genotipovi kukuruza imali su jedinstvenu proteinsku sliku pri čemu se određen broj proteinskih frakcija nalazi na približno istoj poziciji u svim ispitanim uzorcima tako da se koriste kao referentne. Razlike u proteinskom sastavu linija mogu da se koriste i za utvrđivanje veze između hibrida i roditeljskih linija. Metod je brz, jeftin i podaci mogu da se koriste za formiranje genetičke identifikacione karte linija i hibrida kukuruza.

Ključne reči: proteini klice, elektroforeza, genetička identifikacija, genetička čistoća

UVOD: Održavanje genetičke uniformnosti linija i hibrida kukuruza je jedan od preduslova uspešne proizvodnje i plasiranja na tržište komercijalnog hibridnog semena. Genetički nečisto seme dovodi do pojave biljaka čije karakteristike nepredvidljivo odstupaju od očekivanih, a prisustvo semena samooplodene majke u hibridnom semenu do smanjenja prinosa usled smanjenog broja heterotičnih individua. Zato je kontrola genetičke čistoće semena linija i hibrida od velikog značaja za semenarstvo. Najčešće korišćene metode za određivanje genetičke čistoće semena obuhvataju: i) morfološke metode, ii) analiza izozima, iii) izoelektrično fokusiranje zeina. Tradicionalno genetička čistoća semena se određivala praćenjem morfoloških osobina biljaka u različitim fazama razvoja u poljskim uslovima. Međutim morfološke osobine su pod uticajem spoljašnje sredine i nisu pouzdan pokazatelj genotipa (Smith i Wych, 1986). Elektroforeza izozima je dosta korišćena za određivanje genetičke čistoće semena (Cardy et al., 1980, Goodman i Stuber, 1980, Cardy and Kannenber, 1982), kao i za karakterizaciju inbred linija (Goodman i Stuber, 1980, Cardy

and Kannenber, 1982, Stuber and Goodman, 1983) i hibrida (Smith, 1984, Smith and Weissinger, 1984) kukuruza. Mada je metoda veoma efikasna za određivanje genetičke čistoće i genetičku karakterizaciju (Tanksley i Orton, 1983) ima određene nedostatke kao što su dužina trajanja, skupa je, zahteva multilokusnu analizu nekoliko enzima. Izoelektrično fokusiranje zeina se koristi za određivanje genetičke čistoće semena (Righetti et al., 1977, Motto et al., 1979), ali visoka cena ograničava njegovu širu upotrebu. U cilju da se prevaziđu neki od navedenih nedostataka razvijene su jednostavne metode elektroforeze proteina na poliakrilamidnom gelu (Koranyi et al., 1989, Wang et al., 1994) za genetičku identifikaciju genotipova kukuruza kao i za određivanje genetičke čistoće i uniformnosti roditeljskih linija i hibrida kukuruza. Cilj našeg rada je ispitivanje mogućnosti i opravdanosti korišćenja proteina klice za genetičku karakterizaciju inbred linija i hibrida kukuruza i određivanje genetičke čistoće komercijalnih hibrida kukuruza.

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

¹Dr SNEŽANA MLADENVIĆ DRINIĆ, viši naučni saradnik, dr KOSANA KONSTANTINOV, naučni savetnik, Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

Materijal i metode

U radu je analizirano osamnaest samooplodnih linija standardnog kvaliteta zrna, različitih FAO grupa zrenja (200-600) i dva komercijalna hibrida kukuruza standardnog kvaliteta zrna FAO grupe zrenja 400 odnosno 600, proizvedeni u Institutu za kukuruz. Klica je izolovana iz pojedinačnih zrna i tkivo klice je homogenizovano u puferu za ekstrakciju (Laemmli, 1970). Nakon homogenizacije suspenzija je centrifugirana i proteini su razdvojeni elektroforezom na poliakrilamidnom gelu.

Za utvrđivanje genetičke čistoće ispitivanog hibrida analizirano je 100 pojedinačnih klica/genotipu. Na osnovu dobijenih elektroforegrama grupe traka su kodirane na osnovu broja, distribucije i inteziteta traka. Različite kombinacije traka na osnovu inteziteta (dva nivoa: inteziteta slab i jak) i položaja su označene slovima a-k (npr. kombinacija trake jakog inteziteta i iznad nje trake slabog inteziteta je obeležena slovom b).

Rezultati i diskusija

U ovim istraživanjima proteini su izolovani iz klice samooplodnih linija i

komercijalnih hibrida kukuruza. Dobijeni rezultati su pokazali da proteini klice mogu da se koriste za određivanje genetičkog identiteta linija i hibrida kukuruza, kao i za utvrđivanje genetičke čistoće semena. Mada proteinski markeri još nisu genetički mapirani za njihovu praktičnu primenu za identifikaciju germplazme i utvrđivanje genetičke čistoće to nije neophodno (Tanksley, 1983).

Utvrđene su kako kvantitativne tako i kvalitativne razlike (broj, raspored i intenzitet) proteinskih frakcija. Neke proteinske frakcije se nalaze na istoj poziciji i relativno su istog intenziteta u svim ispitanim uzorcima i koriste se kao referentne tako da je u odnosu na njih elektroforegram svakog uzorka podeljen u nekoliko regiona.

Druge proteinske frakcije unutar regiona se razlikuju u zavisnosti od analiziranog genotipa. Grupe proteinskih frakcija su označene prema broju, poziciji i relativnom intenzitetu traka unutar njih. Na taj način je moguće predstaviti svaki genotip specifičnom serijom kodova.

U kodovima brojevi znače pojedinačnu proteinsku frakciju date grupe. Brojevi prikazani u zagradama se odnose na distribuciju frakcija u grupi (2+2 za frakcije sličnog inteziteta u 2+2 distribuciji). Razlike u intenzitetu su označene slovima (a-k).

Tab. 1. Kodovi sedam samooplodnih linija kukuruza

Tab. 1. Codes of seven inbred lines

linija region	1	2	3	4	5	6	7
I	3(1+2) 4(2+2) 1	3(1+2) 4(2+2) 1	3(1+2) 4(2+2) 1	3(1+2) 4(2+2) 1	2k 4(2+2) 1	2k 4(2+2) 1	3(1+2) 4(2+2) 1
II	4(2b+2c) 4(3e+1) 3g	4(2b+2e) 4(3+1) 3d	4(2k+2a) 4(3e+1) 3d	4(3i+1) 4(2b+2) 3g	4(2b+2a) 4(3e+1) 3d	4(3i+1) 4(3+1) 2c	4(3e+1) 4(3+1) 2c
III	3e 2 4(3e+1) 1 1	3e 2a 3(1+2c) 1 3(1+2b)	3e 2a 4(2b+2c) 1 3(1+2b)	4(3i+1) 2a 3g 1 1	3e 2a 3d 1 3e	3g 3(1+2a) 1 2k 1	2b 3(1+2a) 1 2k 1
IV	1 2a 2c	3i 1 2c	3e 1 2c	1 3h 2c	1 2a 2c	1 2a 2c	1 2a 2c

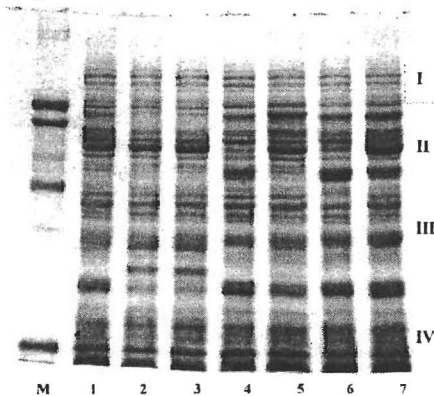
Elektroforezom proteini klice su razdvojeni na veliki broj proteinskih frakcija koje pokazuju heterogenost različitih genotipova kukuruza. Sve ispitivane inbred linije su imale specifičnu proteinsku sliku. Na sl.1 je prikazan elektroforegram sedam od 18 ispitivanih inbred linija kukuruza. Kodovi

ovih linija su prikazani u tab.1. Najveći broj proteinskih frakcija je u regionima II i III.

Elektroforegrami hibridnih kombinacija su poredeni u odnosu na roditelje i koelektroforezu roditelja (L1+L2, očekivan elektroforegram hibrida pod pretpostavkom da se proteini nasleđuju aditivno).

Sl. 1. Elektroforegram proteina klice sedam inbred linija kukuruza

Fig. 1. Electrophoregram of embryo proteins of seven maize inbred lines

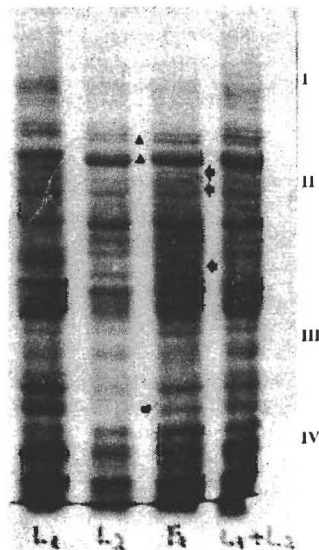


Poređenjem elektroforegrama roditeljskih linija (L1 i L2) i elektroforegrama hibridne kombinacije (L1 x L2) utvrđeno je da postoji nekoliko vrsta proteinskih frakcija: hibrid ima trake zajedničke za oba roditelja; hibrid ima dve trake, jednu od oca drugu od majke (kodominatnost ekspresije roditeljskog gena u hibridima ♦); traka poreklom od majke •; traka poreklom od oca Δ; traka specifična za

hibrid ←. Na sl.2 je prikazan elektroforegram roditeljskih linija i njihove hibridne kombinacije.

Sl. 2. Elektroforegram proteina klice roditeljskih linija (L1, L2) i hibrida kukuruza

Fig. 2 Electrophoregram of embryo proteins of parental lines and hybrids



Tab. 2. Kodovi roditeljskih linija (L1, L2) i hibrida (L1 x L2)

Tab. 2. Scores of inbred lines (L1, L2) and hybrid

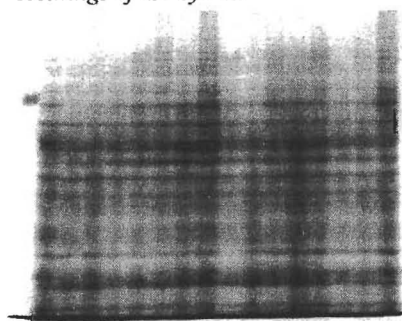
Genotip region	Linija 1 (majka)	Linija 2 (otac)	hibrid	Poreklo frakcija
I	2	2b	2b	Zajedničke
	4(2b+2a)	2k	3(1+2)	Zajedničke
	2	1	1	Zajedničke
II	3e	2c	2c	Otac
	5(2a+3g) 3(2a+1)	4(1+3g) 3(1+2c)	5(1+2b+2) 3(1+2c)	Hibrid otac
III	2c	1	2a	Hibrid
	3(1+2)	4(1+3)	4(1+3)	Zajedničke
	1	1	1	Zajedničke
	1	1	1	Zajedničke
IV	2b	1	1	Zajedničke
	1	2c	1	Majka
	2c	1	2c	Zajedničke
	1		1	Zajedničke

Kod hibrida pored traka koje su zajedničke za oba roditelja i kojih je najveći broj, otkrivene su dve trake nasledene od oca

(L2), jedna traka nasledena od majke i tri trake specifične za hibrid. Poređenjem elektroforegrama hibrida i roditeljskih

komponenti utvrđeno je da proteinska slika hibrida nije prost zbir proteinskih frakcija roditeljskih komponenti što ukazuje na neaditivno nasleđivanje proteina klice. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima Korney-a i sar. (1989) i Wang-a i sar. (1994). Kodovi roditeljskih linija i hibrida su prikazani na tabeli 2.

Sl. 3. *Proteinski kompleks pojedinačnih biljaka komercijalnog hibrida kukuruza*
Fig. 3 *Protein complex of individual seedlings of the hybrid*



Genetički čisto seme kako linija tako i hibrida bi trebalo da pokaže uniformnu proteinsku sliku u svim pojedinačnim klicama. U ovom radu je ispitana genetička čistoća jednog komercijalnog hibrida. Dobijena je uniformna proteinska slika u svim pojedinačnim uzorcima, što ukazuje o genetičkoj čistoći ispitanog semena. Na sl.3 je prikazan proteinski kompleks pojedinačnih

biljaka proučavanog hibrida, FAO grupe zrenja 600. Prema Korney i sar. (1989), neki uzorci imaju heterogenu proteinsku sliku što je posledica intralinijske varijabilnosti koja se kreće od 2-12%. Veći procenat od ovoga je posledica mutacija ili stranooplodnje. U našim ispitivanjima genetičke čistoće roditeljskih komponenti analiziranog hibrida (rezultati nisu prikazani u ovom radu) intralinijska varijabilnost se kretala u ovim granicama. U odnosu na druge metode koje se koriste za utvrđivanje genetičke čistoće semena metoda korišćena u ovom radu je mnogo brža i jeftinija.

Zaključak

Dobijeni rezultati su pokazali da analiza proteina klice elektroforezom na SDS-PAA može da se koristi u oplemenjivanju i proizvodnji semena kukuruza kao brz i jeftin metod za genetičku karakterizaciju selekcionog materijala kao i za ispitivanje genetičke čistoće semena kukuruza. Visoka rezolucija, reproduktivnost, stabilna proteinska slika uzorka su osnovne prednosti ove metode. Jasne razlike proteinskog kompleksa klice različitih genotipova kukuruza osim za utvrđivanje razlika između linija i hibrida mogu da se koriste i za utvrđivanje odnosa između hibrida i roditeljskih komponenti, određivanje stabilnosti inbred linija u procesu oplemenjivanja, određivanje genetičke čistoće linija i hibrida kukuruza kao i utvrđivanje samooplodnje i stranooplodnje u semenu hibrida.

LITERATURA

- CARDY, B.J., STUBER, C.W. and GOODMAN, M.M. (1980): Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize. Institute of Statistics Mimeo Series No.1317. North Carolina State University, Raleigh.
- CARDY, B.J. and KANNENBERG, L.W. (1982): Allozyme variability among maize inbred lines and hybrids: Application for cultivar identification. *Crop Sci.* 22:1016-1020.
- GODMAN M.M. and STUBER, C.W. (1980): Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis. *Proceedings of the Annual Corn and sorghum Research Conference*, 35: 10-31.
- KORNAYI, P. (1989): Simple purity checking of maize lines and hybrids by protein monomer analysis. *Seed Sci. and Tech.* 17: 161-168.
- LAEMMLI, V.K (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- MOTTO, M., SALAMINI, F., REGGIANI, F. and SOAVE, C. (1979): Evaluation of genetic purity in hybrid corn seed production through zein isoelectrophoretic patterns. *Maydica* 24: 223.
- RIGHETTI, P.G., GIANAZA, E., VIOTTI, A. and SOAVE, C. (1977): Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta* 136:115.
- SMITH, J.S.C. and WEISSINGER, H. (1984): Rapid monitoring of purity in seed lots of hybrid maize modifications of current tech-

- nologies. Maize Genetics Cooperation News Letter 58:103-105.
- SMITH, J.S.C. (1984): Genetic variability within U.S. commercial hybrid maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 29: 175-184.
- SMITH, J.S.C. and WYCH, R.D. (1986): The identification of female selfs in hybrid maize: A comparison using electrophoresis and morphology. *Seed Sci. Tech.* 14:1.
- STUBER, C.W. and GOODMAN, M.M. (1983): Allozyme genotypes for popular and historical important inbred lines of corn. U.S. Dept. Of Agriculture, Agriculture Research Service, Southern Series 16:29.
- TANKSLEY, S.D. (1983): Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 3-8.
- TANKSLEY, S.D. and ORTON, T.J. (1983): Isozymes in Plant Genetics and Breeding, parts AQ and B, Elsevier, New York.
- WANG, C., BAIN, K., ZHANG, H., ZHOU, Z. and WANG, J. (1994): Polyacrilamide gel electrophoresis of salt soluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment. *Seed Sci. Tech.* 22:51-57.

GENETICALLY CHARACTERIZATION AND SIMPLE PURITY CHECKING OF MAIZE SEED BY PROTEIN MARKERS

DRINIĆ MLADENVIĆ SNEŽANA AND KONSTANTINOV KOSANA

SUMMARY

Purity control and genetically characterization of maize inbred lines and hybrids have great importance in every phase of experimental or comercial hybrid seed production and inbred maintenance. Embryo proteins as genetic markers for maize genotypic identification as well as genetic purity determination were used. By electrophoresis embryo proteins have been separated into numerous components and showed great heterogeneity. All analysed genotypes have specific protein pattern. Some of protein fraction appeared for each genotype at the same position and could be use as reference bands. The differences of protein complex among various maize varieties could be use to detect relationship between hybrids and their parental lines. The method is rapid, cheap and date can be use to form genetically identification card of inbred lines and hybrids.