

OCENA JAKOŚCI NOWYCH LINII PSZENICY TWARDEJ NA PODSTAWIE CHARAKTERYSTYKI BIAŁEK GLIADYNOWYCH I GLUTENINOWYCH W WARUNKACH STOSOWANIA ZRÓŻNICOWANEGO NAWOŻENIA AZOTEM

Anna Ciołek, Ewa Makarska
Akademia Rolnicza w Lublinie

Streszczenie. Celem badań była charakterystyka elektroforetyczna białek gliadynowych i gluteninowych oraz określenie zawartości białka i glutenu mokrego w ziarniakach 4 linii *Triticum durum* Desf. w warunkach zróżnicowanej podaży azotu. Na podstawie rozdzielów elektroforetycznych frakcji gliadyn (A-PAGE) stwierdzono, że wszystkie linie zawierały podjednostki γ -45 i γ -42. Obserwowano wyraźnie intensywniejsze wybarwienie podjednostek na elektroforegramach gliadyn z obiektów z dwukrotnie zwiększoną podażą azotu. Określając procentowy udział genotypów na podstawie polimorfizmu białek gliadynowych, stwierdzono brak wyrównania genetycznego badanych linii. Ocena jakościowa odmian, na podstawie identyfikacji podjednostek gluteninowych (SDS-PAGE), wykazała, że badane linie zawierały locus *Glu-A1* w kombinacji null. Spośród badanych linii najwyższą zawartością białka i glutenu charakteryzowała się linia LGR 899/62a. W wypadku wszystkich badanych linii stwierdzono wyższą zawartość białka i glutenu po zastosowaniu 180 kg N·ha⁻¹.

Słowa kluczowe: elektroforeza gliadyn i glutenin, białko, gluten, pszenica twarda

WSTĘP

Jednym z ważniejszych czynników oddziałujących na jakość technologiczną pszenicy jest zawartość i skład białek glutenowych ziarniaków [Branlard 1987, Makarska i Kowalczyk 2000, Makarska i Szwed-Urbaś 2000]. Stwierdzono, że zmiany w składzie białek zapasowych warunkują 40-60% zmienności jakości technologicznej pszenicy zwyczajnej [Branlard 1987, Węgrzyn i Waga 1999]. Rozdział i identyfikację tych białek najdogodniej jest przeprowadzać chromatograficznie (w układzie odwróconych faz) lub elektroforetycznie (na żelu poliakryloamidowym). W skład białek endospermu wchodzi

gliadyny – monomeryczne polipeptydy bez wiązań dwusiarczkowych (ω -gliadyny) lub z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami dwusiarczkowymi (α -, β -, γ -gliadyny) i gluteniny – agregaty polimerów stabilizowanych międzypeptydowymi wiązaniami dwusiarczkowymi (gluteniny wielkocząsteczkowe HMW i gluteniny niskocząsteczkowe LMW) [Porceddu i in. 1998].

Gliadyny kodowane są przez kompleks loci *Gli-1* (γ i ω) i *Gli-2* (α i β) zgrupowany na krótszych ramionach chromosomów odpowiednio 1 i 6 grupy homeologicznej: 1A, 1B, 1D, 6A, 6B, 6D [Payne i in. 1987, Porceddu i in. 1998]. Gluteniny wysokocząsteczkowe kodowane są przez geny zlokalizowane na dłuższych ramionach chromosomów 1 grupy homeologicznej (kompleks loci *Glu-1*): 1A, 1B, 1D, natomiast geny odpowiadające za syntezę glutenin LMW (kompleks loci *Glu-3*) znajdują się na krótszych ramionach chromosomów 1A, 1B i 1D blisko genów kodujących białka gliadynowe (*Gli-1*) [Porceddu i in. 1998].

Pszenica twarda jest tetraploidem – posiada dwie grupy chromosomów A i B. W porównaniu z pszenicą zwyczajną jest ona pozbawiona zarówno białek gliadynowych, jak i podjednostek gluteninowych kodowanych na chromosomach grupy D [Ruiz i Carrillo 1993].

Grupa frakcji białek zapasowych, kodowana sprzężonymi genami zlokalizowanymi na jednym chromosomie, nosi nazwę bloku białkowego [Sozinov i Poperella 1980]. Bloki te identyfikuje się na podstawie katalogów: białka gliadynowe – tzw. katalog Popereli [Poperella i Sobko 1987], podjednostki gluteninowe, tzw. katalog Payne'a [Payne i Lawrence 1983]. Symbole poszczególnych bloków określają rodzaj białka, numer chromosomu kodującego dany blok oraz jego numer katalogowy w wypadku gliadyn lub numery prążków elektroforetycznych w wypadku glutenin.

Tzw. lepkość glutenu, czynnik istotny dla jakości kulinarnej makaronu, jest związana z obecnością pewnych komponentów ω i γ -gliadyn oraz niskocząsteczkowych podjednostek glutenin kodowanych przez geny zespołu loci *Gli-B1* i *Glu-B3*. Nie rozstrzygnięto jednoznacznie, czy pewne właściwości glutenu są wynikiem obecności gliadyn z loci *Gli-B1*, niskocząsteczkowych glutenin *Glu-B3* czy obu typów prolamin [Ruiz i Carrillo 1995]. Wiadomo natomiast, że geny kodujące *Glu-B3* (tzw. LMW-1 i LMW-2) są ściśle związane z locus *Gli-B1* kodującym alleliczne gliadyny odpowiednio γ -42 i γ -45 [Porceddu i in. 1998].

Celem badań była ocena analizy elektroforetycznej białek glutenowych oraz oznaczenie zawartości białka i glutenu 4 linii *Triticum durum* Desf. w warunkach zróżnicowanej podaży azotu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiły ziarniaki 4 linii jarej pszenicy *Triticum durum* Desf. (LGR 899/62a, LGR 1359/8, LGR 896/23, LGR 899/17a) (tab. 1) ustalone morfologicznie i wyselekcjonowane z kilku populacji mieszańców w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin AR w Lublinie.

Ścisłe doświadczenie polowe przeprowadzono w GD Felin AR w Lublinie w latach 1999-2001. Pszenicę uprawiano stosując zróżnicowane nawożenie azotem, w formie saletry amonowej, tj.: 90 kg N \times ha⁻¹ i 180 kg N \times ha⁻¹ (tab. 1). Porównawczo uprawiano pszenicę zwyczajną 'Sigma'.

Tabela 1. Oznaczenia stosowane w pracy
Table 1. Symbols applied in paper

Linie i odmiana Lines and cultivar		Nawożenie azotowe Nitrogen fertilization	
LGR 899/62a	L1	90 kg N × ha ⁻¹	N1
LGR 1359/8	L2		
LGR 896/23	L3	180 kg N × ha ⁻¹	N2
LGR 899/17a	L4		
Sigma	S		

Charakterystykę frakcji gliadynowej przeprowadzono metodą elektroforezy A-PAGE wg metodyki Brzezińskiego i in. [1989], a frakcji gluteninowej – metodą SDS-PAGE wg Brzezińskiego i Łukaszewskiego [1998] i Brzezińskiego [1993]. Podczas elektroforezy glutenin, w celu standaryzacji, zastosowano wzorcowe odmiany pszenicy twardej: ‘Primadur’, ‘Megadur’ i ‘Capdur’ o znanym składzie podjednostek kodowanych na chromosomach 1A i 1B. Zawartość białka ogółem (N × 5,7) oznaczono metodą Kjeldahla na automatycznym aparacie Kjeld-Foss. Oznaczenie zawartości glutenu wykonano wg PN-68/A-74041. Wyniki oceniono metodą analizy wariancji wieloczynnikowej z zastosowaniem testu Tukeya.

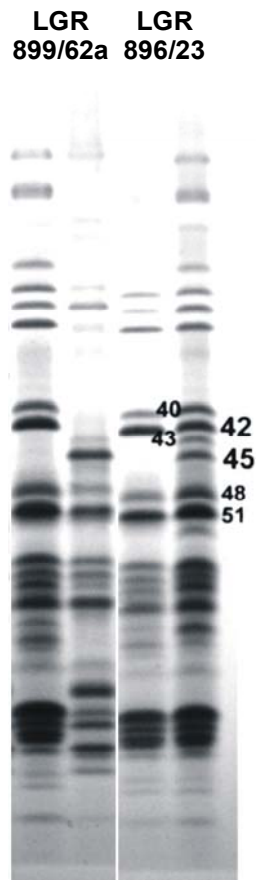
WYNIKI I DISKUSJA

Gliadyny

Analiza elektroforetyczna frakcji gliadyn badanych linii pszenicy twardej dostarczyła wiele komponentów wskazujących na pewne zróżnicowanie zwłaszcza w obrębie α i β gliadyn.

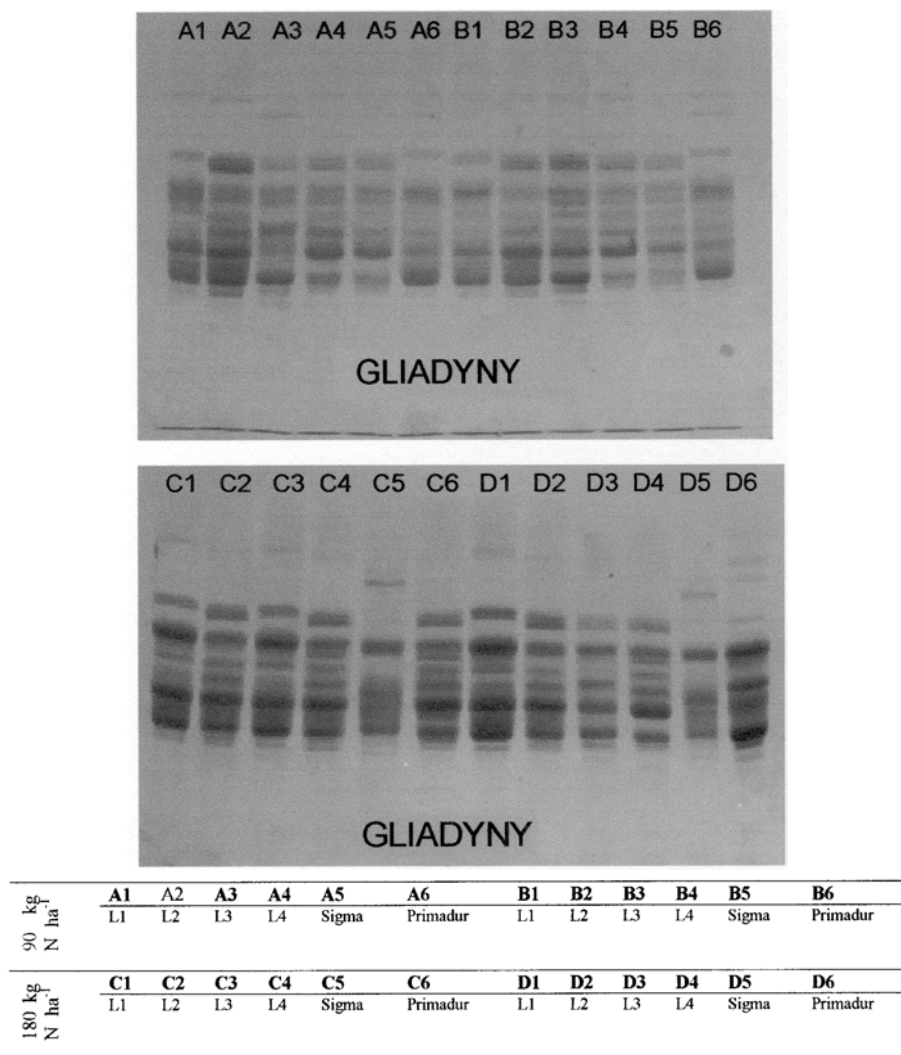
W niniejszej pracy, na podstawie rozdzielów elektroforetycznych, stwierdzono u wszystkich badanych linii występowanie podjednostek gliadyn γ-45 i γ-42. Przykładowo przedstawiono identyfikację tych podjednostek dla linii L1 i L3 (rys. 1). Białka te występowały z różną częstotliwością w analizowanych ziarniakach.

Gliadyny γ-45 i γ-42 związane z niskocząsteczkowymi gluteninami LMW-1 i LMW-2 mają specyficzne cechy hydrofobowości powierzchniowej, odpowiadające za jakość makaronu podczas gotowania. Rozważane są często jako markery jakościowe [Ruiz i Carrillo 1995].



Rys. 1. Elektroforegram (Acid-PAGE) gliadyn pszenicy linii LGR 899/62a (2 pojedyncze ziarniaki) i LGR 896/23 (2 pojedyncze ziarniaki)

Fig. 1. Electrophoregram (Acid-PAGE) of gliadin from lines LGR 899/62a (2 single kernels) and LGR 896/23 (2 single kernels)



Rys. 2. Elektroforegramy (Acid-PAGE) gliadyn 4 linii pszenicy twardej i odmiany 'Primadur' (wzorec pszenicy durum) oraz odmiany pszenicy zwyczajnej 'Sigma'

Fig. 2. Electrophoregrams (Acid-PAGE) of gliadin from four lines of durum wheat and cultivar 'Primadur' (standard of durum wheat) and cultivar of common wheat 'Sigma'

Rozdział elektroforetyczny wykazał brak wyrównania badanych linii w odniesieniu do białek gliadynowych. Dowodzi to zróżnicowania na krótkich ramionach chromosomów A i B pierwszej i szóstej grupy homeologicznej pszenicy twardej. Analizując obrazy elektroforetyczne gliadyn (dla 50 pojedynczych ziarniaków) określono procentowy udział genotypów na podstawie polimorfizmu tych białek. Pod względem frekwencji elektroforegramów o tym samym układzie podjednostek najbardziej stabilna była linia L2 – (90:2:2:2:2). Praktycznie dwuliniowo przedstawia się także linia L1 – (65:33:2).

Zastosowanie w uprawie pszenicy dwukrotnie zwiększonej dawki azotu nie miało wpływu na jakościowe zróżnicowanie podjednostek gliadyn w ziarnie (rys. 2). Wnioski te potwierdzają badania innych autorów, wykazujące, że białka te są determinowane genetycznie, a czynniki środowiska mogą wpływać na zmiany ilościowe, ale mają znikomy wpływ na fluktuacje jakościowe gliadyn [Branlard 1987, Autran i Bourdet 1975]. Rozdział gliadyn wyekstrahowanych z 2 pojedynczych ziarniaków (schemat na rys. 2) z obiektów z niższą i wyższą dawką azotu wskazuje natomiast wyraźnie na silniejsze wybarwienie podjednostek w wypadku zastosowania 180 kg N × ha⁻¹.

Gluteniny

Dla pszenic *T. durum* komponenty gluteninowe kodowane są przez loci *Glu A1 Glu B1* [Ruiz i Carrillo 1993]. Rozdział elektroforetyczny i identyfikacja glutenin wykazała obecność kodowanej chromosomem 1A podjednostki null (tab. 2). Występowanie u wszystkich badanych linii pszenicy twardej Glu A1-„null” (N) nie jest zjawiskiem korzystnym, gdyż gluteniny kodowane przez geny w tzw. wariacie niekodującym typu null pogarszają jakość technologiczną pszenic. Wśród polskich odmian i rodów pszenicy zwyczajnej te białka występują najczęściej [Waga 1996].

Tabela. 2. Skład wysokocząsteczkowych podjednostek glutenin w liniach pszenicy twardej, odmianie pszenicy zwyczajnej ‘Sigma’ oraz odmianach wzorcowych pszenic twardych
Table 2. Composition of highmolecular glutenin subunits in durum wheat lines, cultivar of common wheat ‘Sigma’ and standard cultivars of durum wheat

Linie i odmiany Lines and cultivars	Skład podjednostek kontrolowanych przez loci Composition of subunits encoded by loci			Wartość wskaźnika Glu-1 Value of Glu-1 index
	Glu – A1	Glu – B1	Glu – D1	
1 LGR 899/62 ^a	N	17+18	–	4
2 LGR 1359/8	N	6+8	–	2
3 LGR 896/23	N	7+8	–	4
4 LGR 899/17 ^a	N	7+8	–	4
5 Sigma	2*	14+15	2+12	8
Odmiany wzorcowe Standard cultivars				
6 Primadur	N	7+8	–	4
7 Megadur	2*	17+18	–	6
8 Capdur	N	6+8	–	2

W analizowanych liniach zidentyfikowano obecność podjednostek gluteninowych kodowanych przez loci *Glu B1* dla: L1 – 17+18, L2 – 6+8 oraz dla L3 i L4 ten sam blok glutenin – 7+8 (rys. 3, tab. 2). Obliczono także wartości wskaźnika Glu-1 dla poszczególnych linii na podstawie schematu punktacji jakościowej podanej przez Payne’a i in. [1987]. Najniższą punktację glutenin uzyskała linia L2 (2 p. jakościowe). Natomiast pozostałe linie dorównywały wartościom wskaźnika Glu-1 dobrej jakościowo francuskiej odmiany ‘Primadur’ (4 p. jakościowe). W tabeli 2 zamieszczono także skład podjednostek



Rys. 3. Elektroforegram (SDS-PAGE) glutenin 4 linii pszenicy twardej i odmiany 'Primadur' (wzorec pszenicy twardej) oraz odmiany pszenicy zwyczajnej 'Sigma'. 1 – LGR 899/62a, 2 – LGR 1359/8, 3 – LGR 896/23, 4 – LGR 899/17a, 5 – 'Sigma', 6 – 'Primadur'

Fig. 3. Electrophoregram (SDS-PAGE) of glutenin from four lines of durum wheat and cultivar 'Primadur' (standard of durum wheat) and cultivar of common wheat 'Sigma'. 1 – LGR 899/62a, 2 – LGR 1359/8, 3 – LGR 896/23, 4 – LGR 899/17a, 5 – 'Sigma', 6 – 'Primadur'

glutenin u odmian wzorcowych pszenic twardej ('Megadur' i 'Capdur'), za pomocą których identyfikowano podjednostki obecne w badanych liniach.

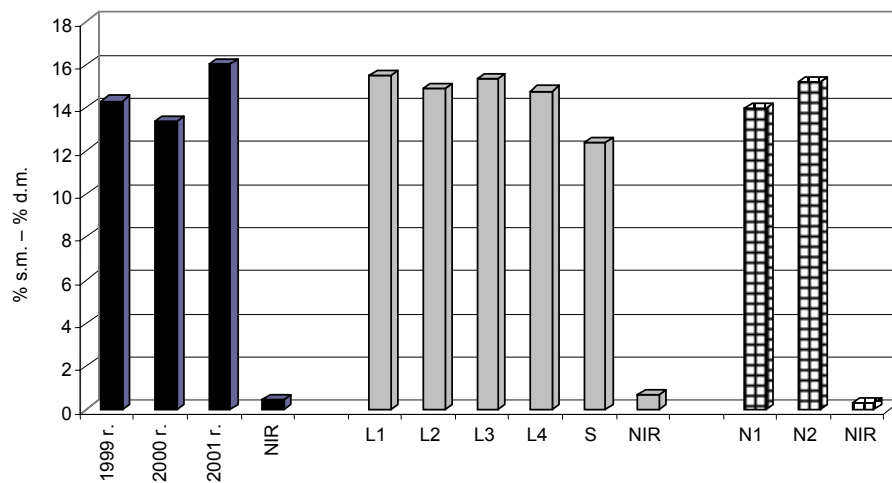
Zgodnie z oczekiwaniem nie stwierdzono wpływu zróżnicowanego nawożenia azotem na zmiany jakościowe rozdzielonych glutenin.

Zawartość białka i glutenu

Zawartości białka oraz glutenu należą do bardzo ważnych kryteriów oceny jakości pszenic. W wypadku pszenicy twardej zawartość białka może wynosić 9-18% s.m. i jest zwykle wyższa niż u pszenicy zwyczajnej [Szwed-Urbaś 1990]. Semolina otrzymana z pszenicy twardej powinna zawierać minimum 13% białka, inaczej uzyskiwany z niej makaron będzie gorszej jakości – kruchy i łamliwy [Obuchowski 2000].

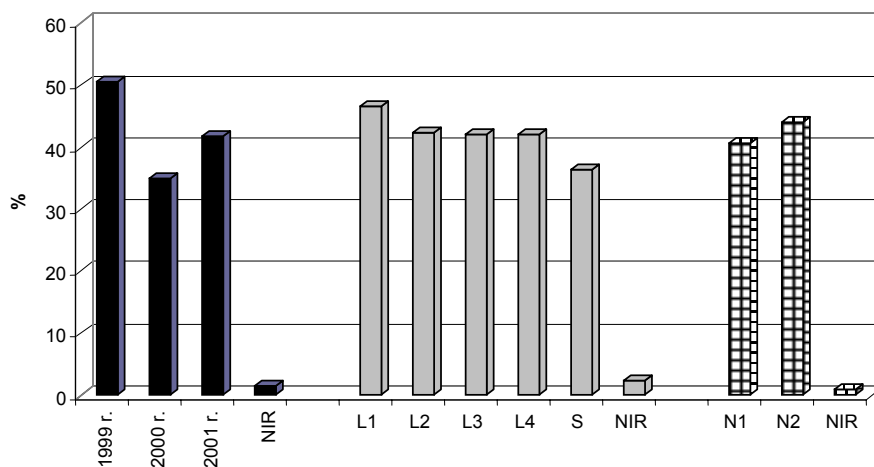
W niniejszej pracy, spośród badanych linii najwyższą zawartością białka i glutenu w trzyleciu wyróżniła się linia L1, odpowiednio $\bar{x} = 15,49\%$ s.m. (rys. 4) i $\bar{x} = 46,49\%$ (rys. 5). Pozostałe linie pszenicy twardej stanowią grupę statystycznie jednorodną zarówno pod względem zawartości białka, jak i glutenu mokrego.

Stwierdzono istotny statystycznie wzrost zawartości białka i glutenu w wypadku zwiększonego nawożenia azotowego zarówno u pszenicy twardej, jak i zwyczajnej (rys. 4 i 5). Dodatni wpływ nawożenia azotowego na badane parametry jest zależnością znaną i jest zgodny z badaniami prowadzonymi przez np. Ryana i in. [1997].



Rys. 4. Zawartość białka ogółem (% s.m.) w ziarnie pszenicy w zależności od lat badań, linii (odmiany) i nawożenia azotem

Fig. 4. Total protein content (% d.m.) in grain of wheat depending on years, lines (cultivar) and nitrogen fertilization



Rys. 5. Zawartość glutenu mokrego (%) w ziarnie pszenicy w zależności od lat badań, linii (odmiany) i nawożenia azotem

Fig. 5. Wet content (%) in grain of wheat depending on years, lines (cultivar) and nitrogen fertilization

PODSUMOWANIE

Na podstawie rozdziałów elektroforetycznych frakcji gliadyn (A-PAGE) stwierdzono, że wszystkie linie zawierały podjednostki γ -45 i γ -42. Białka te (markery jakościowe) występowały z różną częstotliwością. Obserwowano wyraźnie intensywniejsze wybarwienie podjednostek na elektroforegramach gliadyn z obiektów z dwukrotnie zwiększoną podażą azotu. Na podstawie elektroforegramów gliadyn (dla 50 pojedynczych ziarniaków) określono procentowy udział genotypów biorąc pod uwagę udział frekwencji diagramów o tym samym układzie podjednostek i stwierdzono brak wyrównania genetycznego badanych linii. Ocena jakościowa odmian, na podstawie identyfikacji podjednostek gluteninowych (SDS-PAGE), wykazała brak zróżnicowania glutenin kodowanych na chromosomie 1A.

Pośród badanych linii najwyższą zawartością białka i glutenu charakteryzowała się linia LGR 899/62a (L1). W wypadku wszystkich badanych linii stwierdzono wyższą zawartość białka i glutenu po zastosowaniu $180 \text{ kg N} \times \text{ha}^{-1}$.

PIŚMIENNICTWO

- Autran J.C., Bourdet A., 1975. L'identification des variétés de blé: Etablissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électroforétique des gliadines du grain. *Ann. Amélior. Plant.* 25 (3), 277-311.
- Branlard G., 1987. Prediction on the bread wheat quality from HMW glutenin and gliadins gluten proteins. *Proc. of the 3rd Intern. Workshop, Budapest*, 604-612.
- Brzeziński W., 1993. Katalog elektroforetyczny pszenic polskich. *Słupia Wielka*, 54, 10-11.
- Brzeziński W., Van Gelder W.M.J., Mendelewski P., Kolster P., 1989. Polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadins: the use of a moving boundary for improved resolution. *Euphytica* 40, 207-212.
- Brzeziński W., Lukaszewski A.J., 1998. Allelic variation at the Glu-1, Sec-2 and Sec-3 loci in winter triticale. *Proc. 4th Int. Triticale Symp. Red Deer, Alberta*, 2, 6-12.
- Makarska E., Kowalczyk A., 2000. Analiza elektroforetycznej oceny frakcji glutenin ziarniaków *Triticum durum* Desf. na tle wybranych testów jakościowych. 31 Sesja Nauk. KTICHŻ PAN, Poznań, 12.
- Makarska E., Szwed-Urbaś K., 2000. Analiza składu wysokocząsteczkowych podjednostek gluteninowych ziarniaków *Triticum durum* Desf. i *Triticum aestivum ssp. vulgare L.* 36 Zjazd P.T. Bioch. Poznań, 108.
- Obuchowski W., 2000. Ocena jakości surowców zbożowych wykorzystywanych do produkcji makaronu. *Przeł. Zboż.-Młyn.* 1, 32-34.
- Payne P., Nightingale M., Krattiger A., Holt L., 1987. The Relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40, 51-65.
- Payne P., Lawrence G., 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci GluA1, GluB1, GluD1, which code for high-molecular-weight subunits of gluten in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.* 11, 1, 29-35.
- Poperella F.A., Sobko T.A., 1987. Genetika gliadina ozimoy miagkoj pszenicy. *Wapn. Genet. Sel. Ziarn. Kultur.* 3, 231-242.
- Porceddu E., Turchetta T., Masci S., D'Ovidio R., Lafiandra D., Kasarda D.D., Impiglia A., Nachit M.M., 1998. Variation in endosperm protein composition and technological quality properties in durum wheat. *Euphytica*. 100, 197-205.

- Ruiz M. Carrillo J.M., 1993. Linkage relationships between prolamin genes on chromosomes 1A and 1B in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87, 353-360.
- Ruiz M. Carrillo J.M., 1995. Separate effects on gluten strength of Gli-1 and Glu-3 prolamin genes on chromosomes 1A and 1B in durum wheat. *J. Cereal Sci.* 1 (2), 137-144.
- Ryan J., Nsarellah N., Mergoum M., 1997. Nitrogen fertilization of durum wheat cultivars in the rainfed area of Morocco: biomass, yield and quality considerations. *Cereal Res. Commun.* 25 (1), 85-90.
- Sozinov A.A., Poperella F.A., 1980. Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding. *An. Techn. Agric.* 29, 229-249.
- Szwed-Urbaś K., 1990. Zawartość białka i cechy fizyczne ziarna wybranych odmian pszenicy twardej (*Triticum Durum* Desf.). *Biul. IHAR.* 173/174, 35-39.
- Waga J., 1996. Charakterystyka frakcji białek gliadynowych i gluteninowych odmian i rodów pszenicy ozimej z kolekcji IHAR i ich związek z liczbą sedimentacji. *Biul. IHAR.* 197, 3-14.
- Węgrzyn S., Waga J., 1999. Powiązanie białek gluteninowych ze zmiennością ważniejszych cech użytkowych odmian i rodów pszenicy ozimej. *Biul. IHAR.* 211, 55-69.

ESTIMATION OF QUALITY OF NEW LINES OF DURUM WHEAT ON THE BASIS OF GLIADIN AND GLUTENIN CHARACTERIZATION UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT NITROGEN FERTILIZATION SUPPLY

Abstract. The aim of the studies was the electrophoretic characterization of gliadin and glutenin proteins and evaluation of protein and wet gluten contents in kernels of 4 *Triticum durum* Desf. lines under conditions of different nitrogen supply. On the basis of electrophoretic separation of gliadin fraction (A-PAGE) it was found that all lines contained γ -45 and γ -42 subunits. Clearly more intensive dyeing of sub-units on electrophoregrams of gliadins from objects with two times higher nitrogen supply, was observed. Evaluating the percentage of genotype share on the basis of gliadin protein polymorphism, lack of genetic uniformity of studied lines was found. Qualitative assessment of varieties – on the basis of glutenin subunit identification (SDS-PAGE) – revealed that studied lines contained *Glu-A1* locus at null combination. Among the studied lines, LGR 899/62a line was characterized with the highest protein and gluten contents. In the case of all the studied lines, higher protein and gluten contents after application of 180 kg N \times ha⁻¹ was observed.

Key words: electrophoresis of gliadin and glutenin, protein, gluten, durum wheat

Zaakceptowano do druku – Accepted: 9.11.2004 r.

Do cytowania - For citation: Ciolek A., Makarska E., 2004. Ocena jakości nowych linii pszenicy twardej na podstawie charakterystyki białek gliadynowych i gluteninowych w warunkach stosowania zróżnicowanego nawożenia azotem. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 3(2), 147-155.