

## SKÚMANIE ZMIEN PROFILU BIELKOVÍN V SEMENÁCH LÁSKAVCA PODROBENÝCH RADIÁČNEJ MUTAGENÉZE

ANDREA HRICOVÁ<sup>a</sup>, MONIKA KEČKEŠOVÁ<sup>b</sup>,  
ZDENKA GÁLOVÁ<sup>b</sup>, GABRIELA LIBIAKOVÁ<sup>a</sup>  
a ALENA GAJDOŠOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra, <sup>b</sup> Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko andrea.hricova@savba.sk

Došlo 13.9.10, prepracované 2.11.10, prijaté 11.11.10.

Kľúčové slová: láskavec, bielkovinové frakcie, SDS-PAGE, nutričná kvalita, radiačná mutagenéza

### Úvod

Druhy rodu *Amaranthus* priťahujú v posledných rokoch záujem ako významná agronomická plodina v rôznych častiach sveta. Mnohé sú tolerantné k suchu, vysokým teplotám či zasoleniu, čím predstavujú vhodnú alternatívu pre podmienky globálneho otepľovania. Ako C<sub>4</sub> typ rastliny môžu prispieť k zníženiu CO<sub>2</sub> v atmosfére, čo je hlavný faktor vyvolávajúci skleníkový efekt. Pre jeho vysokú produkciu biomasy a schopnosť akumulovať ťažké kovy môže slúžiť aj ako obnoviteľný zdroj energie a pre procesy fytooremediácie<sup>1,2</sup>.

Láskavec má zaujímavé chemické zloženie, významný nutričný potenciál s vysokým obsahom esenciálnych zložiek, ktoré majú pozitívny vplyv na ľudské zdravie. Prednosťou semien láskavca je pomerne vysoký obsah bielkovín, škrobu a tukov<sup>3</sup>, obsahuje 2 až 3krát viac lyzínu ako obilniny<sup>4</sup> a v porovnaní so strukovinami v semenách láskavca je vyššie zastúpenie sírnych aminokyselín<sup>5</sup>. Okrem toho je vhodným zdrojom zdraviu prospešnej vlákniny, antioxidantov, minerálnych látok a vitamínov. Významnou charakteristikou láskavca je nízky podiel lepko- tvorných bielkovín v semenách, a preto môžu byť výrobky z neho vyrobené konzumované pri bezlepkovej diéte a výžive ľudí trpiacich alergiou na lepok (celiakia).

Šľachtenie tejto alternatívnej pseudocereálie je v začiatkoch a poukazuje na potrebu ďalšieho výskumu. Za posledných 20. rokov sa prehĺbili poznatky o nutričnej kvalite a využití láskavca v racionálnej výžive<sup>6</sup>. Počas tohto obdobia bolo vyšľachtených niekoľko desiatok nutrične obohatených odrôd, ktorých komerčné pestovanie je rozšírené najmä v USA a Mexiku<sup>7</sup>. Okrem klasických postupov kríženia sa na zlepšovanie požadovaných vlastností využívajú aj napr. indukované mutácie. Informácie

o indukovanom mutačnom šľachtení láskavca, rovnako ako aplikácia biotechnológií v šľachtiteľskom procese, sú doposiaľ značne limitované<sup>6</sup>. Naš výskum je zameraný práve na využitie radiačnej mutagenézy, v kombinácii s inovatívnymi biotechnologickými prístupmi, ku zvýšeniu kvality a kvantity produkcie semien a v ďalšej fáze na biochemickú a molekulárnu charakterizáciu selektovaných mutantných línií.

Cieľom tejto práce bolo porovnanie biochemickej analýzy (obsah bielkovín, zastúpenia bielkovinových frakcií, elektroforetický profil zásobných bielkovín) semien mutantných línií získaných radiačnou mutagenézou v porovnaní s kontrolnými, neožiarenými vzorkami. Porovnaním získaných profilov a údajov o obsahu bielkovín sme vyhodnotili nutričnú kvalitu semien mutantov ako aj vplyv mutagenézy na túto významnú charakteristiku láskavca.

### Experimentálna časť

#### Použitie vzorky

Analýzovali sme vzorky semien 9 mutantných línií láskavca a 2 kontrolných, neožiarených genotypov *A. cruentus* „Ficha“ (vzorka A) a hybridu „K-433“, ktorý je výsledkom medzidruhového kríženia *A. hypochondriacus* × *A. hybridus* (vzorka B; GB ÚVRP, ČR). Línie sme získali pomocou mutagenézy pôsobením ( $\gamma$ )-žiarenia v dávke 175 Gy (cit.<sup>8</sup>), realizovanej v spolupráci s medzinárodnou atómovou agentúrou IAEA v rámci medzinárodného programu "The Joint FAO/IAEA programme".

#### Stanovenie obsahu celkového dusíka, obsahu bielkovín a bielkovinových frakcií

Celkový dusík sme stanovili podľa Kjeldahla<sup>9</sup> a zastúpenie bielkovín sme vypočítali z obsahu dusíka vynásobením prepočítacím koeficientom (% N × 5,7). Bielkovinové frakcie boli extrahované v príslušných rozpúšťadlách podľa unifikovanej Golenkovej metódy – ICC metóda<sup>10</sup>. Zo zastúpenia bielkovinových frakcií sme vypočítali koeficient nutričnej kvality [((albumíny + globulíny + zvyšok)/gliadíny) × 100].

#### Extrakcia zásobných bielkovín

Extrakciu zásobných bielkovín sme realizovali podľa štandardnej referenčnej metódy ISTA (Wrigley, 1992). Glutenínové podjednotky boli extrahované z mechanicky homogenizovaných suchých semien. Rozdrvené semená (šrot) boli vložené do 1,5 ml polypropylénovej ependorfovej skúmavky. Na 1 mg rozdrvených semien bolo pridaných 8  $\mu$ l vždy čerstvého extrakčného roztoku, v zložení: 4,25 ml zásobného roztoku (12,5 ml mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pH 6,8; 20 ml glycerolu; 24,1 ml redestilovanej vody; 4,0 g SDS; 20,0 mg Pyronín G príp. Y) +

0,75 ml 2-merkaptóetanolu + 10 ml redistilovanej vody. Extrakcia prebiehala 30 min pri laboratórnej teplote za stáleho miešania na magnetickej trepačke. Vzorky boli ďalej zohriate na 100 °C po dobu 10 min. Po ochladiení a odstredení (15 000 ot. min<sup>-1</sup>, 10 min) bol supernatant zliaty do novej skúmavky.

#### Elektroforetická frakcionácia zásobných bielkovín v SDS-PAGE

Delenie HMW glutenínových podjednotiek prebehlo vertikálnou diskontinuálnou elektroforézou PAGE v prítomnosti SDS podľa metodiky ISTA (Wrigley, 1992). Hrúbka gélu bola určená hrúbkou použitého tesnenia 1 mm. Celková plocha gélu pozostávala zo štartovacieho a separačného gélu, v ktorom prebieha hlavné delenie bielkovín. Zloženie deliaceho gélu: 11,43 ml mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pH 8,8; 17,48 ml roztoku AA-BIS (54,49 g akrylamidu + 0,72 g *N,N'*-metylénbisakrylamidu v objeme 250 ml); 0,3 ml 10% (w/v) roztoku SDS; 0,76 ml 4% (w/v) roztoku persíranu amónneho; 0,06 ml TEMED. Na deliaci gél bol nanesený štartovací gél (1,236 ml mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pH 6,8; 8,3 ml roztoku AA-BIS (7,29 g akrylamidu + 0,125 g *N,N'*-metylénbisakrylamidu v objeme 100 ml) vo vrstve vysokej 2–3 cm, do ktorej bol zasunutý hrebeň vytvárajúci komôrky pre nanášanie vzoriek. Vzorky boli do gélu nanesené v množstve 10 µl. Elektroforetické delenie prebiehalo za prítomnosti elektródového tlmivého roztoku (14,1 g glycínu + 3 g Tris-HCl + 1 g SDS v objeme 1000 ml) pri 10 mA, 500 V a 50 W približne 6–10 hodín,

pri konštantnej teplote 15 °C, až kým farebný marker Pyronin G nedosiahol spodný okraj gélu.

#### Farbenie a vizualizácia bielkovín

Všetky frakcie zásobných bielkovín laskavca separované v SDS-PAGE boli zafarbené počas noci v roztoku obsahujúcom 190 ml 10% kyseliny trichlóroctovej a 10 ml 0,5% Coomassie brilliant blue R250 v etanole. Prebytočné farbivo bolo z gélu odstránené premývaním gélu v destilovanej vode 12–24 hodín. Densitometrické záznamy elektroforetických profilov jednotlivých genotypov boli vyhodnotené pomocou systému GelWorks 1D pre Windows. Ako štandardy boli použité odrody pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) Chinese Spring a Marquis.

### Výsledky a diskusia

V minulosti bol náš výskum zameraný na aplikáciu radiačnej mutagenézy pre zlepšenie kvantity produkcie laskavca ako aj kvality niektorých hospodársky dôležitých vlastností. Výsledkom je zbierka desiatok mutantných línií s preukazne zvýšenou hmotnosťou tisíc semien (HTS), ktorú považujeme na základe výsledkov analýz niekoľkých generácií za geneticky fixovaný znak<sup>8</sup>. Pokúsili sme sa vyhodnotiť vplyv mutagenézy na nutričnú kvalitu semien niekoľkých vybraných línií so zvýšenou HTS.

Pri hodnotení nutričnej kvality semena je dôležitý obsah bielkovín, predovšetkým však zastúpenie bielkovi-

Tabuľka I

Percentuálne vyjadrenie obsahu bielkovín, jednotlivých bielkovinových frakcií a koeficienta nutričnej kvality v analyzovaných vzorkách semien laskavca

Vzorka	HB <sup>a</sup>	Alb + Glo <sup>b</sup>	Pro <sup>c</sup>	Glu <sup>d</sup>	Pro + Glu	Nerozpustný zvyšok	KNK <sup>e</sup>
A <sup>f</sup>	11,99	57,32	2,95	27,99	30,94	11,36	2328,1
B <sup>f</sup>	12,96	53,59	3,08	27,14	30,22	15,31	2237,0
$\bar{x} \pm \sigma$	12,5 ± 0,7	55,5 ± 2,6	3,0 ± 0,1	27,6 ± 0,6	30,6 ± 0,5	13,3 ± 2,8	2283 ± 64
$v^h$ [%]	5,46	4,76	3,05	2,18	1,66	20,95	2,82
C15/3	12,80	59,54	2,94	27,94	30,88	8,81	2444,93
C26/2	10,00	50,79	2,75	29,65	32,40	16,57	1676,19
C26/3	10,88	54,00	3,67	33,76	37,43	7,96	2324,83
C27/5	11,20	58,90	3,99	28,79	32,78	7,98	2429,47
C82/1	12,47	58,55	2,85	27,44	30,29	10,69	2679,69
C236/1	11,43	52,47	2,76	28,02	30,78	15,01	2136,25
D54/1	13,60	54,25	2,56	28,20	30,76	14,35	1940,48
D279/1	11,59	54,84	3,09	30,76	33,85	11,17	2449,45
D282/1	13,04	48,93	3,31	31,20	34,51	15,30	1688,28
$\bar{x} \pm \sigma$	11,9 ± 1,2	54,7 ± 3,7	3,1 ± 0,5	29,53 ± 2,0	32,6 ± 2,3	12 ± 3,4	2197 ± 36
$v$ [%]	9,76	6,78	15,20	6,95	7,15	28,21	16,32

<sup>a</sup> HB – hrubé bielkoviny, <sup>b</sup> Alb – albumíny, Glo – globulíny, <sup>c</sup> Pro – prolamíny, <sup>d</sup> Glu – glutelíny, <sup>e</sup> KNK – koeficient nutričnej kvality, <sup>f</sup> A, B – kontrolné neožiarené vzorky; <sup>g</sup>  $\bar{x} \pm \sigma$  aritmetický priemer a smerodajná odchýlka, <sup>h</sup>  $v$  – variačný koeficient

Tabuľka II

Kvantitatívne vyhodnotenie SDS-PAGE analýzy zásobných bielkovín v analyzovaných vzorkách semien laskavca

Vzorka	HMW-GS [%] <sup>a</sup>	LMW-GS + Gli [%] <sup>b</sup>	Zvyškové Alb + Glo [%] <sup>c</sup>
A <sup>d</sup>	0,00	40,01	59,99
B <sup>d</sup>	0,57	40,07	59,36
$\bar{x} \pm \sigma$	$0,29 \pm 0,40$	$40,04 \pm 0,04$	$59,67 \pm 0,44$
$v^f$ [%]	141,42	0,10	0,74
C15/3	1,57	38,29	60,15
C26/2	0,84	43,13	56,03
C26/3	0,79	39,02	60,19
C27/5	0,80	44,00	55,20
C82/1	0,26	33,96	65,78
C236/1	0,00	41,22	58,78
D54/1	0,34	37,25	62,41
D279/1	0,00	42,63	57,37
D282/1	0,21	36,91	62,89
$\bar{x} \pm \sigma$	$0,53 \pm 0,51$	$39,60 \pm 3,36$	$59,87 \pm 3,44$
$v$ [%]	95,72	8,48	5,75

<sup>a</sup> HMW-GS – vysokomolekulárne glutenínové podjednotky, <sup>b</sup> LMW-GS + Gli – nízkomolekulárne glutenínové podjednotky a zvyškové gliadíny, <sup>c</sup> Alb + Glo – zvyškové albumíny a globulíny, <sup>d</sup> A, B – kontrolné neožiarené vzorky, <sup>e</sup>  $\bar{x} \pm \sigma$  – aritmetický priemer a smerodajná odchýlka, <sup>f</sup>  $v$  – variačný koeficient

nových frakcií, a s tým súvisiaci obsah esenciálnych aminokyselín. V analyzovaných vzorkách mutantných línií laskavca sme stanovili priemerný obsah bielkovín 11,89 %, čo je o 4,6 % menej oproti kontrole (tab. I). Najvyšší obsah hrubých bielkovín dosiahla línia D54/1 (13,6 %), naopak najnižší bol stanovený v línií C26/2 (10 %).

Laskavec, tak ako aj väčšina pseudocereálií, sa v porovnaní s konvenčnými obilninami vyznačuje vysokým podielom nutrične plnohodnotných protoplazmatických bielkovín (albumíny, globulíny) a súčasne nízkym podielom zásobných bielkovín (glutelíny, prolaminy)<sup>9,12</sup>. Pri hodnotení koeficienta nutričnej kvality, ktorý má výpovednú hodnotu vo vzťahu k výživnej kvalite semena, možno konštatovať, že priemerná hodnota bola vo vzorkách mutantov o 4 % nižšia v porovnaní s kontrolami (tab. I). Štyri línie (C82/1, D279/1, C15/3, C27/5,) z 9 analyzovaných, dosiahli v porovnaní s neožiarenými formami semien vyššiu hodnotu. Na základe uvedeného faktu možno semená analyzovaných mutantných línií laskavca hodnotiť ako semená s porovnateľnou až vyššou výživnou kvalitou v porovnaní s kontrolou.

Nutričná kvalita semien je ovplyvnená predovšetkým frakčným zastúpením bielkovín, pričom najvyšším obsahom esenciálnych aminokyselín sa vyznačujú protoplazmatické bielkoviny<sup>13</sup>. Z našich výsledkov vyplýva, že obsah albumínov a globulínov sa pohyboval v rozmedzí od 48,93 % do 59,54 %, s priemerom 54,7 %, čo je o 1,4 % menej v porovnaní s kontrolnými vzorkami (tab. I). Tri línie (C15/3, C27/5, C82/1) dosiahli oproti kontrole vyššiu hodnotu. Na druhej strane zastúpenie nepľnohodnotných

zásobných bielkovín sa pohybovalo v rozsahu od 30,29 % do 37,43 %, čo je o 6,3 % viac oproti neožiarenej kontrole. Podľa niektorých autorov<sup>9,14</sup> je obsah zásobných bielkovín v semenách laskavca v porovnaní so pšenicou v priemere o 50 % nižší. Zastúpenie frakcie prolaminov bolo v semenách v priemere 3,3 %, čo je v súlade so závermi iných autorov<sup>9</sup>, ktorí stanovili ich obsah v kolekcii laskavca v priemere 2,93 %, čo vyhovuje potrebám pre prípravu potravín bezlepkovej diéty.

Elektroforetickou separáciou zásobných bielkovín pomocou SDS-PAGE (tab. II) sme identifikovali vysokomolekulárne glutenínové podjednotky (HMW-GS) a nízkomolekulárne glutenínové podjednotky (LMW-GS), z ktorých je možné detegovať rôzne vlastnosti genotypov<sup>15</sup>. Zastúpenie HMW-GS, ktoré ovplyvňujú technologickú kvalitu semena, bolo v mutovaných líniách v priemere 0,53 %, čo je o 0,24 % viac v porovnaní s kontrolnými vzorkami (tab. II). V zastúpení LMW-GS línie C 26/2, C27/5, C 236/1 a D 279/1 dosiahli oproti kontrole vyššiu hodnotu.

Celkovo možno konštatovať, že nutričná kvalita mutantných línií sa v porovnaní s neožiarenými formami vplyvom mutagenézy významne nezvýšila. Najzaujímavejšou zo získaných línií je línia C82/1, ktorá dosiahla najvyššiu nutričnú hodnotu v porovnaní s ožiarenými ako aj neožiarenými vzorkami. Uvedené je v súlade s výsledkami iných autorov<sup>16</sup>, ktorí študovali vplyv chemomutagénu *N*-nitrozo-*N*-etylmočoviny na zrno pšenice Astella, pričom priemerný obsah albumínov, globulínov a gliadínov bol vyšší v porovnaní s nemutovanou vzorkou, kým percentuálne zastúpenie glutenínov bolo nižšie.

## Záver

Na základe predbežných výsledkov je možno konštatovať, že z nutričného hľadiska sme získali pomocou indukovanej radiačnej mutagenézy niekoľko zaujímavých línií láskavca. Najvýznamnejšie sa vplyv radiácie prejavil v mutantnej línii C82/1, v ktorej sme zistili v porovnaní s neožiarenými formami vyšší koeficient nutričnej kvality ako aj vyšší podiel albumínov a globulínov, ktoré sa vyznačujú optimálnym zložením esenciálnych aminokyselín a charakterizované sú ako plnohodnotné frakcie bielkovín.

Z hľadiska využitia mutagenézou získaných línií v šľachtiteľskom programe láskavca, sa v ďalšom štádiu budeme zaoberať ich detailnejšou charakteristikou a získaním poznatkov o iných dôležitých biochemických vlastnostiach, ako je obsah vitamínov A, C, E, ako najdôležitejších antioxidantov, zastúpenie aminokyselín, obsah skvalénu či profil lipidov v semenách.

*Táto práca bola financovaná v rámci grantových výskumných úloh VEGA č. 1/0471/09 a VEGA č. 2/0109/09.*

## Použité skratky

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS elektroforéza na polyakrylamidovom géli)
HTS	hmotnosťou tisíc semien
HMW-GS	high molecular weight glutenin subunits (vysokomolekulárne glutenínové podjednotky)
LMW-GS	low molecular weight glutenin subunits (nízkomolekulárne glutenínové podjednotky)

## LITERATÚRA

- Joshi B. D., Rana R. S.: *Grain amaranths: The future food crop*. National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi 1991.
- Williams J. T., Brenner D., v knihe: *Grain amaranth (Amaranthus species)* (Williams J. T., ed.), zv. II, kap. 3. Chapman and Hall, London 1995.
- Žajová A.: *XIV. Česko-slovenská bioklimatologická konferencia, Lednice na Moravě, 2.- 4. září 2002*, str. 645. Sborník abstraktů (Rožnovský E., Litschmann T., ed.), 2002.
- Gajdošová A., Šturdík E.: *Nova Biotechnologica* 4, 133 (2004).
- Gorinstein S., Zemser M., Fliess A., Shnitman I., Paredes-Lopez O., Yamamoto K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 845 (1998).
- Brenner D. M., Baltensperger D. D., Kulakow P. A., Lehmann J. W., Myers R. L., Slabbert M. M., Sleugh B. B.: *Plant Breed. Rev.* 19, 227 (2001).
- Myers R. L.: *Legacy* 8 (1996).
- Gajdošová A., Libiaková G., Fejér J., v knihe: *Breeding of Neglected and Under-utilized Crops, Spices, and Herbs* (Ochatt S., Jain S. M., ed.), kap. 10. INRA, Dijon 2007.
- Michalík I., Gálová Z., Urminská D., Knoblochová H., v knihe: *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*, kap. 4. SPU, Nitra 2006.
- Michalík I.: *Agriculture* 48, 333 (2002).
- Wrigley C. W.: *Seed Analysis*, 1992, 17.
- Bressani R., Garcia-Vela L. A.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 1205 (1990).
- Gálová Z., Palenčárová E., Balážová Ž.: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, Piešťany, 12.-13. nov. 2008*, Zborník z 15. vedeckej konferencie (Šudyová V., Gregorová E., ed.), str. 12. SCPV: Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany 2008.
- Muchová Z.: *Rostl. Vyroba* 46, 331 (2000).
- Gálová Z., Knoblochová H., Gregáňová Ž., Starovičová M.: *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín, Piešťany, 27.-28. máj 2003*, Zborník z 3. odborného seminára (Benediková D., ed.), str. 36. Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany 2003.
- Gálová Z., Švec M., Chňapek M.: *Výživa zvierat 2006 - Proteiny, Brno, 8.jún 2006*, Zborník vedeckých prác, str. 72. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno 2006.

**A. Hricová<sup>a</sup>, M. Kečkešová<sup>b</sup>, Z. Gálová<sup>b</sup>, G. Libiaková<sup>a</sup>, and A. Gajdošová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Nitra*, <sup>b</sup>*Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agriculture University, Nitra, Slovakia*): **Investigation of Protein Profile Changes in Amaranth Seeds after Radiation Mutagenesis**

The main focus of the study was to investigate the changes in protein content due to radiation mutagenesis by comparing the protein profile of amaranth mutant lines with that of untreated controls. We have found several promising lines with high coefficients of nutrition quality. Considering overall nutrition values, the line C82/1 is the most promising genotype, which could be possibly used in a future breeding programme. The protein composition of amaranth seeds can be changed and their nutrition values significantly influenced through radiation mutagenesis.