

V skyrius. AUGALŲ SELEKCIJA IR GENETIKA

ISSN 1392-3196

Žemdirbystė. Mokslo darbai, 2005, 2, 90, 94-105

UDK 633.32:581.19

DOBILŲ RŪŠIŲ IR TARPRŪŠINIŲ HIBRIDŲ CHARAKTERIZAVIMAS PAGAL FERMENTŲ IR SĖKLŲ BALTYMŲ ELEKTROFORETINES ANALIZES

Vanda PAPLAUSKIENĖ, Giedrė DABKEVIČIENĖ

Lietuvos žemdirbystės institutas

Akademija, Dotnuva, Kėdainių rajonas

El. p. genetik@lzi.lt

Santrauka

Ištirti peroksidazių (PO) ir superoksido dismutazių (SOD) elektroforetiniai spektrai raudonuosiuose dobiluose (*Trifolium pratense* L.), laukiniuose (*Trifolium diffusum* Ehrh.), kultūriniuose (*Trifolium ambiguum* Bieb.), rausvuosiuose dobiluose (*Trifolium hybridum* L.) ir jų tarprūšiniuose hibriduose. Lyginant *Trifolium pratense* ir *Trifolium diffusum* rūšis, rasta specifinių SOD ir PO komponentų, tuo tarpu *T. ambiguum* ir *T. hybridum* spektrai tapatūs. Hibridinių (*T. pratense* x *T. diffusum*) populiacijų F₁, B₁F₂ ir B₂F₃ dobilai turėjo visą arba dalinį tėvinių rūšių SOD ir PO komponentų rinkinį, kurį papildė originalūs, tik hibriduose atsirandantys komponentai. *T. pratense* x *T. diffusum* F₁ hibriduose aptikti du SOD spektrai, kurie patvirtina hibridinę jų prigimtį. Bekrosinėse linijose, kilusiose iš *T. pratense* x (*T. pratense* x *T. diffusum*) kryžminimo, hibridiškumas buvo patvirtintas 49,6 % individų, kiti augalai SOD spektrus turėjo tokius pat kaip motininė rūšis. Tiriant PO polimorfizmą F₁ populiacijoje, hibridiškumas patvirtintas 96,7 %, likusių individų spektrai identiški *T. pratense*. Bekrosinėse B₁F₂ ir B₂F₃ populiacijose 76,0 % augalų turėjo hibridinę prigimtį patvirtinančius, likę 24,0 % individų - motininės *T. pratense* rūšies spektrus. Nustatyta, kad *T. pratense* x *T. diffusum* hibridams atpažinti būtina abiejų fermentų (SOD ir PO), spektrų analizė.

T. ambiguum ir *T. hybridum* rūšyse tirti ir kitų fermentų: fosfogliukoizomerazių (PGI), glutamatoksalattransferazių (GOT), leucinaminopeptidazių (LAP) elektroforetiniai spektrai. Tarprūšiniuose *T. ambiguum* x *T. hybridum* hibriduose nustatyti du PGI spektrai, pagal kuriuos pavyko patvirtinti 60,8 % tirtų individų hibridiškumą. Dobilų *T. ambiguum* ir *T. hybridum* LAP bei GOT spektrai turi kiekvienai rūšiai būdingus komponentus, bet tarp-rūšiniai hibridai pagal šiuos spektrus identiški motininei *T. ambiguum* rūšiai.

T. pratense ir *T. diffusum* sėklų atsarginių baltymų elektroforetiniuose spektruose nustatyti dobilų rūšims būdingi (Rf 0,19 ir Rf 0,33) komponentai, specifiskai ženklinantys šias dobilų rūšis. Tarprūšinių F₁ hibridų baltymų spektre yra abiejų dobilų rūšių baltymų komponentai, patvirtinantys pastarųjų hibridiškumą. Bekrosinių B₁F₂ ir B₂F₃ hibridų baltymų spektrai dvejopi: I- tokie pat kaip *T. pratense*; II- *T. pratense* spektras, papildytas nauju Rf 0,16 komponentu, nebūdingu tėvinėms formoms.

Reikšminiai žodžiai: dobilai, tarprūšiniai hibridai, fermentai, sėklų baltymai, elektroforetiniai spektrai.

Įvadas

Selekcionuojant pašarines žoles, vis didesnę reikšmę įgauna tolimoji hibridizacija. Tolimieji kryžminimai sėkmingai taikomi varpinių pašarinių žolių selekcijoje /Pašakinskienė, 2000; Nekrošas, Sliesaravičius, 2004/. Tarp dobilų yra rūšių, pasižyminčių vertingomis selekciniais požūriu savybėmis. Laukinė rūšis *T. diffusum* Ehrh. pasižymi saavidulka, *T. ambiguum* Bieb. – atsparumu ligoms bei ilgaamžiškumu. Tarprūšiniuose hibriduose siekiama apjungti naudingąsias savybes viename, kokybiškai naujame genome /Marshall ir kt., 2002; Abberton ir kt., 2003/.

Sukūrus tarprūšinius hibridus, svarbu juos atpažinti. Pastaruoju metu tam naudojami įvairūs biocheminiai metodai, tarp jų fermentų ir sėklų baltymų elektroforetinių spektrų analizė /Krishman, Sleper, 1997; Marshall ir kt., 1995; Malaviya, 2004/. Nustatyta, kad rūšių *T. repens* L. ir *T. hybridum* L. dobilai turėjo skirtingus fermentų esterazių, peroksidazių, polifenoloksidazių, superoksidodismutazių spektrus. Jų tarprūšinių hibridų elektroforetiniame spektre buvo ne tik abiemis tėvinėms rūšims būdingi, bet ir nauji komponentai /Przywara ir kt., 1989/. Tarprūšiniams *T. repens* L. x *T. nigrescens* Viv. hibridams identifikuoti ir įvertinti sėkmingai naudota fosfoliukoizomerazių, leucinaminopeptidazių bei amilazių spektrų analizė /Marshall ir kt., 1995/. Dalis tarprūšinių *T. alexandrinum* x *T. apertum* hibridų pagal superoksidodismutazių, alkoholdehidrogenazių bei peroksidazių spektrus tapatūs motininei dobilų rūšiai /Malaviya ir kt., 2004/.

Sėklų baltymai – prolaminai yra fiksuotas ir stabilus varpinių augalų genietinis požymis. Pagal baltymų spektrus galima atrinkti vertingas augalų formas arba sekti kaip hibridai paveldi atskirus baltymų komponentus, atsakingus už svarbius požymius ar savybes /Konarev ir kt., 2000; Alpatijeva, Gubareva, 2002/. Nustatyta, kad javuose yra tam tikri ryšiai tarp baltymų komponentinės sudėties ir grūdų kokybės rodiklių bei atsparumo stresiniams veiksniams /Johanson ir kt., 2000; Alpatieva, Gubareva, 2002, Starovičova ir kt., 2003/. Atsarginių baltymų elektroforetinio spektro analizė sėkmingai panaudota kai kurioms varpinių žolių veislėms /Krishman, Sleper, 1997/ ir svidrių-eraičinų hibridams atpažinti /Paplauskienė, 1998; Hahn, Schoberlein, 1999/. Konstatuota, kad SDS – PAGE elektroforezė yra patikimas metodas atskiroms ankštinių augalų gentims ir rūšims atpažinti, tuo tarpu baltymų profiliai porūšiuose ir kituose taksonuose dažniausiai tapatūs /Haider, Shanshoury, 2000; Valizadeh, 2001/.

Darbo tikslas – ištirti dobilų *T. pratense* L., *T. diffusum* Ehrh., *T. hybridum* L. ir *T. ambiguum* Bieb. rūšių fermentų ir sėklų baltymų elektroforetinius spektrus ir nustatyti jų tinkamumą tarprūšiniams hibridams atpažinti.

Tyrimų objektas ir metodika

Tirtos dobilų rūšys ir tarprūšinių hibridų populiacijos:

1. *T. pratense* L., (derlingi, nepakankamai sėklingi ir neatsparūs ligoms), veislės – ‘Liepsna’ ($2n = 2x = 14$) ir ‘Vyliai’ ($2n = 4x = 28$).
2. *T. diffusum* Ehrh., $2n = 2x = 16$ (laukinė forma, saavidulkiai, nederlingi, atsparūs ligoms, vienamečiai).

3. *T. ambiguum* Bieb., $2n = 2x, 4x, 6x = 16, 32, 48$ (laukiniai, sudaro šaknines atžalas, ilgaamžiai, atsparūs ligoms).

4. *T. hybridum* L., (derlingi, nepakankamai sėklingi ir neatsparūs ligoms, pakenčia rūgščias dirvas). Veislė – ‘Daubiai’ ($2n = 2x = 16$).

5. Tarprūšiniai hibridai F_1 tarp *T. pratense* ir *T. diffusum* ir bekrosinės populiacijos: B_1F_2 ($\text{♀}F_1$), B_1F_2 ($\text{♀}T. pratense$), B_2F_3 ($\text{♀}T. pratense$), B_2F_3 ($\text{♂}T. diffusum$) ir B_2F_3 ($\text{♀}T. pratense$), pasižyminti padidintu atsparumu doobilų vėžio sukėlėjui.

6. Tarprūšiniai hibridai F_1 tarp *T. ambiguum* ir *T. hybridum*.

Dobilų auginimas, tarprūšinių hibridų gavimas. Dobilų rūšys ir jų hibridai auginami šiltnamyje po tris viename vegetaciniame inde, palaikant 22-25°C temperatūrą, 13 tūkst. liuksų apšvietimą, 16 val. fotoperiodą. Tarprūšiniai hibridai tarp *T. pratense* x *T. diffusum* ir *T. ambiguum* x *T. hybridum* gauti pritaikius gemalų kultūros metodą. Fertilumas hibriduose *T. pratense* x *T. diffusum* atkurtas naudojant kolchicinavimą /Dabkevičienė, 2000/. Bekrosiniai hibridai gauti atlikus grįžtamuosius kryžminimus:

1. $F_1 \times T. pratense \rightarrow B_1F_2(\text{♀}F_1)$.

2. $T. pratense \times F_1 \rightarrow B_1F_2(\text{♀}T. pratense)$.

3. $T. pratense \times B_1F_2 \rightarrow B_2F_3(\text{♀}T. pratense)$.

4. $B_1F_2 \times T. diffusum \rightarrow B_2F_3(\text{♂}T. diffusum)$.

Fermentų tyrimų metodika. Fermentai išskirti iš 4-6 savaičių amžiaus doobilų lapų. Analizei imta viena dalis šviežiai nuskintų lapų, pridėjus antioksidantinių askorbo ir gliutamino rūgščių, esant ne aukštesnei kaip 4 °C temperatūrai sutrinama iki vientisos masės ir įpilama dvi dalys ekstrahavimo buferio. Gauta masė gerai išmaišyta, nusunkta per tankų audinį ir centrifuguota 5-7 tūkst. apsisukimų per minutę greičiu 10 minučių Supernatantas naudotas elektroforetiniais tyrimams, į gelio šulinėlį įnešta po 0,5 ml ekstrakto, nudažyto bromfenolio mėliu. Peroksidazių (PO) ir superoksidodismutazių (SOD) elektroforezė atlikta 7,5 % poliakrilamidiniame gelyje, tris-glicininiame, pH 8,3 buferyje. PO fermentai ir SOD ryškinti pagal metodikas /Safonov, Safonova, 1971; Pasteur ir kt., 1987/. Fermentų esterazių (EST), glutamatoksalattransferazių (GOT), leucinaminopeptidazių (LAP), fosfogliukoizomerazių (PGI), rūgštinių fosfatazių (ACP), alkoholdehidrogenazių (ADH) elektroforezė atlikta 11 % krakmolo gelyje tris-citratboratiniame, pH 8,3 buferyje, kiekvieno fermento spektrai ryškinti pagal atitinkamas metodikas /Pasteur ir kt., 1987/.

Baltymų išskyrimas ir elektroforezė. Dobilų baltymų tyrimui imta ne mažiau kaip 200 vnt. sėklų, nuvalyti lukštai ir sutrinta iki miltelių. Pasverta 0,04 g sutrintų sėklų ir užpilta 0,5 ml ekstrahavimo buferio. Baltymų išskyrimas ir jų elektroforezė SDS – tris glicininiame pH 8,3 buferyje atlikta pagal metodiką /Gardiner, Forde, 1988/.

Elektroforetiniai baltymų sėklų tyrimai atlikti tik rūšyse *T. pratense* ir *T. diffusum* bei jų hibriduose. F_1 hibridai tarp *T. ambiguum* ir *T. hybridum* ir po kolchicinavimo procedūrų buvo sterilūs (nemezgė sėklų), todėl atlikti šiuos tyrimus nebuvo galimybės. Tyrimų duomenų statistinė analizė atlikta taikant kompiuterinę programą ANOVA iš paketo „SELEKCIJA” /Tarakanovas, Raudonius, 2003/.

Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Fermentų elektroforetiniai tyrimai dobilų rūšyse ir tarprūšiniuose hibriduose. Dobilų *T. pratense* ir *T. diffusum* rūšių SOD spektre nustatyti 4 komponentai: po vieną (Rf 0,61 ir Rf 0,67), būdingą kiekvienai rūšiai, du (Rf 0,81 ir Rf 0,78), sutampantys abiejose tėvinėse formose (1 lentelė). Mūsų tirtų veislių ‘Liepsna’ ir ‘Vyliai’ SOD spektrai tapatūs, juose yra 3 komponentai. Dobilų *T. alexandrinum* ir *T. apertum* rūšių SOD spektrai taip pat reprezentuojami tik 3 komponentais /Malaviya ir kt., 2004/. Tuo tarpu tiriant įvairių raudonųjų dobilų diploidų bei tetraploidų veislių šio fermento spektrus, nustatyti 7 skirtingo elektroforetinio judrumo komponentai /Lange ir kt., 2000/.

Tarprūšinių *T. pratense* x *T. diffusum* hibridų SOD spektras pasipildo nauju, nebūdingu dobilų rūšims, komponentu Rf 0,63. Hibridams būdingi dvejopi SOD spektrai: I- abiejų tėvinių dobilų rūšių elektroforetinių spektrų komponentai papildyti nauju Rf 0,63, II- *T. pratense*, spektras su nauju komponentu. Reiškinyms, kai hibriduose fiksuojami nauji, tėvinėms formoms nebūdingi komponentai, aprašytas ir kitų tyrėjų bandymuose. Tiriant hibridus tarp *T. repens* ir *T. hybridum* konstatuota, kad elektroforetiniame spektre yra ne tik abiem tėvinėm rūšims būdingi, bet ir nauji komponentai /Przywara ir kt., 1989/.

F₁ hibriduose nustatyti I (78,6 %) ir II (21,4 %) SOD spektrai, tai patikimai patvirtino hibridinę tiriamųjų individų prigimtį. Tiriant bekrosinius hibridus nustatyta, kad 50,4 % atitiko *T. pratense* spektrą ir 0,7 % – *T. diffusum* spektrą. Likę bekrosiniai hibridai turėjo F₁ hibridams būdingus SOD spektrus: I – 31,4 %, II – 17,5 % tirtų individų. Dobilų *T. ambiguum* ir *T. hybridum* rūšys turėjo vienodus SOD spektrus. Analogiškai rezultatai gauti tiriant *T. alexandrinum* ir *T. apertum* rūšis /Malaviya ir kt., 2004/.

1 lentelė. Dobilų *T. pratense*, *T. diffusum* rūšių bei jų tarprūšinių hibridų SOD elektroforetiniai spektrai ir jų pasikartojimų dažnumas (%)

Table 1. Frequency of SOD electrophoretic spectra in clover *T. pratense*, *T. diffusum* species and their interspecific hybrids

SOD spektrai <i>SOD spectra</i>	SOD komponentai, Rf <i>SOD banding patterns, Rf</i>					Spektrų pasikartojimų dažnumas % <i>Frequency of spectra %</i>	
	0,81	0,78	0,67	0,63	0,61	F ₁	B ₁ +B ₂
<i>T. pratense</i>	+	+	–	–	+	0	50,4
<i>T. diffusum</i>	+	+	+	–	–	0	0,7
I	+	+	+	+	+	78,6	3,4
II	+	+	–	+	+	21,4	17,5
	R ₀₅ / LSD ₀₅					4,06	5,50

+ komponentas yra, – komponento nėra / + component present, – component absent

T. pratense ir *T. diffusum* PO spektruose komponentų daugiau, tarpusavyje spektrai skyrėsi tik dviejų (Rf 0,41 ir Rf 0,64) komponentų varijavimu (2 lentelė). F₁ hibriduose nustatyti 6 PO spektrai: I – yra abiejų tėvinių formų komponentai (ji turėjo 59,0 % augalų); II – yra abiejų tėvinių formų ir papildomas Rf 0,17 komponentas – 11,5 %; III – *T. pratense* spektras, papildytas Rf 0,17 fragmentu – 13,1 %; IV – yra abiejų tėvinių rūšių komponentai ir papildomas fragmentas Rf 0,89-4,9 %; V – spektras turi abiejų tėvinių rūšių ir du papildomus Rf 0,17 ir Rf 0,89 komponentus – 13,1 %. Nežymi dalis F₁ hibridų (3,3 %) turėjo PO spektrą, tapatų *T. pratense* spektrui. Šis pastebėjimas neprieštaruoja kitų autorių išvadoms, naujų komponentų atsiradimas tarprūšinių hibridų PO spektruose taip pat pastebėtas ir tarp kitų dobilų rūšių /Malaviya ir kt., 2004/. Bekrosiniuose individuose be jau minėtų penkių PO spektrų, nustatytas dar vienas – VI tipas, turintis *T. pratense* spektro ir papildomą (0,89) komponentus. Hibridinę tiriamų augalų prigimtį patvirtinantys spektrai buvo būdingi 76,0 % individų. Nemažai augalų (24,0 %) pagal PO spektro komponentų išsidėstymą buvo tapatūs motininei *T. pratense* dobilų rūšiai. Taigi fermentų SOD ir PO elektroforetinių spektrų analizės rezultatai leidžia atpažinti tarprūšinius hibridus tarp *T. pratense* ir *T. diffusum*. Apibūdinant F₁ hibridus, hibridiškumo vertinimai pagal SOD ir PO spektrus sutapo 92,3 %, bekrosiniuose hibriduose – 66,7 %. Vieno fermento spektro analizės hibridiškumui patvirtinti nepakanka. Tais atvejais, kai vieno fermento analizė neįrodo hibridinės prigimties, pagal kito fermento spektro analizės rezultatus galima atpažinti tiriamą individą kaip tarprūšinį hibridą.

2 lentelė. Dobilų *T. pratense*, *T. diffusum* rūšių bei jų tarprūšinių hibridų PO elektroforetiniai spektrai ir jų pasikartojimų dažnumas (%)

Table 2. Frequency of PO electrophoretic spectra in clover *T. pratense*, *T. diffusum* species and their interspecific hybrids

PO spektrai PO spectra	PO fragmentai, Rf PO banding patterns, Rf								Spektrų pasikartojimų dažnumas % Frequency of spectra %	
	0,89	0,64	0,41	0,24	0,21	0,17	0,10	0,09	F ₁	B ₁ +B ₂
<i>T. pratense</i>	–	–	+	+	+	–	+	+	3,3	24,0
<i>T. diffusum</i>	–	+	–	+	+	–	+	+	0	0
I	–	+	+	+	+	–	+	+	59,0	8,0
II	–	+	+	+	+	+	+	+	11,5	3,4
III	–	–	+	+	+	+	+	+	13,1	21,3
IV	+	+	+	+	+	–	+	+	4,9	17,3
V	+	+	+	+	+	+	+	+	8,2	17,3
VI	+	–	+	+	+	–	+	+	0	8,7
	R ₀₅ / LSD ₀₅								3,64	3,62

+ komponentas yra, – komponento nėra / + component present, – component absent

Mūsų tirtų dobilų *T. ambiguum* ir *T. hybridum* rūšių PO spektrai tapatūs. Literatūriniais duomenimis, dobilų rūšių *T. repens* ir *T. hybridum* PO spektrai turi nemažai bendrų, bet yra ir kiekvienai rūšiai specifinių komponentų, jų tarprūšinių hibridų spektruose yra dalis rūšims būdingų komponentų /Przywara ir kt., 1989/.

Kadangi SOD ir PO elektroforetinių spektrų analizė netinka tarprūšiniams *T. ambiguum* x *T. hybridum* hibridams atpažinti, šioms rūšims ženklinti bei hibridiškumui įvertinti naudota kitų – PGI, GOT, LAP, ACP, ADH, EST – spektrų analizė.

T. ambiguum ir *T. hybridum* augaluose PGI spektrai turi po du komponentus, specifiskai ženklinančius šias rūšis (3 lentelė). Literatūros duomenimis, įvairių dobilų rūšių PGI spektre yra nustatyta net 16 skirtingų komponentų /Lange ir kt., 2000/. Dalies (39,2 %) mūsų tirtų tarprūšinių *T. ambiguum* x *T. hybridum* hibridų PGI spektrai tapatūs motininei *T. ambiguum* dobilų rūšiai. Kitų hibridų spektruose yra abiejų dobilų rūšių komponentai, pagal kurių išsidėstymą nustatyti du PGI spektrai: I – yra abu *T. ambiguum* ir vienas didelio elektroforetinio judrumo (Rf 0,74) komponentas, būdingas *T. hybridum*. Šio tipo spektrą turėjo 39,2 % augalų; II – yra abu *T. hybridum* ir vienas komponentas (Rf 0,68), specifiskai ženklinantis *T. ambiguum* rūšį. Šis PGI spektras būdingas 21,6 % tirtų augalų. Tuo tarpu tarprūšinių F₁ *T. repens* x *T. nigrescens* hibridų PGI spektrai tapatūs tėvinei *T. nigrescens* dobilų rūšiai, o dauguma bekrosinių hibridų tapatūs motininei *T. repens* formai /Marshall ir kt., 1995/. *T. subterraaneum* veislėse nustatyti du PGI spektrai, kurie būdingi tam tikroms dobilų veislėms /Odoardi ir kt., 2000/.

3 lentelė. Dobilų rūšių *T. ambiguum*, *T. hybridum* ir jų F₁ hibridų PGI spektrai bei jų pasikartojimų dažnumas (%)

Table 3. Frequency of PGI electrophoretic spectra in clover *T. ambiguum*, *T. hybridum* species and their interspecific hybrids

PGI spektrai <i>PGI spectra</i>	PGI komponentai, Rf <i>PGI banding patterns, Rf</i>				Spektrų pasikartojimų dažnumas % <i>Frequency of spectra %</i>
	0,74	0,68	0,53	0,47	
<i>T. ambiguum</i>	–	+	+	–	39,2
<i>T. hybridum</i>	+	–	–	+	0
I	+	+	+	–	39,2
II	+	+	–	+	21,6
	R ₀₅ / LSD ₀₅				2,83

+ komponentas yra, – komponento nėra / + component present, – component absent

Atlikus GOT elektroforetinių spektrų analizę nustatyta, kad *T. ambiguum* spektras susideda iš keturių (Rf 0,56, Rf 0,45, Rf 0,36 ir Rf 0,26) komponentų, o rūšį *T. hybridum* atstovauja tik vienas bendras abiem dobilų rūšims (Rf 0,56) komponentas. Visi tirti tarprūšiniai *T. ambiguum* x *T. hybridum* hibridai pagal GOT spektro sudėtį buvo vienodi ir tapatūs motininei *T. ambiguum* rūšiai.

Panašūs rezultatai gauti analizuojant ir LAP spektro komponentinę sudėtį. Nors pavyko nustatyti komponentus, specifiskai ženklinančius rūšis *T. ambiguum* ir *T. hybridum*, F₁ hibridų spektro sudėtis atitiko motininės rūšies spektrą, todėl patvirtinti hibridinę prigimtį buvo neįmanoma. Panašūs rezultatai gauti tiriant *T. repens* L. x *T. nigrescens* bekrosinių hibridų LAP elektroforetinius spektrus, didesnės dalies šio fermento spektrai tapatūs motininei *T. repens* L. rūšiai /Marshall ir kt., 1995/.

Tiriant ACP, ADH ir EST spektrus, pastebėti skirtumai tarp tėvinių formų, bet šių fermentai silpnai išreikšti, todėl jie nebuvo naudoti hibridiškumui vertinti. Nors dobilų *T. alexandrinum* ir *T. apertum* rūšių ACP spektruose nustatyti jų komponentinės sudėties skirtumai, bet didesnės dalies jų tarprūšinių hibridų spektrai buvo tapatūs motininei formai /Malaviya ir kt., 2004/.

Elektroforetiniai baltymų tyrimai dobilų T. pratense ir T. diffusum bei jų hibridų sėklose. Tėvinių *T. pratense* ir *T. diffusum* baltymų elektroforetiniai spektrai skyrėsi kai kurių didesnės molekulinės masės (97-45 KDa) komponentų sudėtimi, o kitų nusidažymo intensyvumu (4 lentelė). Užfiksuoti du komponentai, savitai ženklinantys šias rūšis: *T. pratense* ženkлина komponentas Rf 0,19, *T. diffusum* – Rf 0,33. Panašaus dydžio baltymų komponentinės sudėties skirtumai pastebėti ir tarp kitų dobilų rūšių /Gardiner, Forde, 1988/.

4 lentelė. *T. pratense*, *T. diffusum* ir jų tarprūšinių hibridų sėklų baltymų elektroforetinių spektrų komponentinė sudėtis

Table 4. Seed protein banding spectra of clover *T. pratense*, *T. diffusum* species and their interspecific hybrids

Komponentų judrumas, Rf <i>Relative mobility, Rf</i>	Molekulinių masių žymuo, KDa <i>Molecular weight marker, KDa</i>	<i>T. pratense</i>	<i>T. diffusum</i>	Tarprūšinių hibridų baltymų spektrai <i>Seed protein spectra in interspecific hybrids</i>		
				I	II	III
1	2	3	4	5	6	7
0,16		–	–	–	+	–
0,19		+–	–	+–	+–	+
0,20	66	+–	+	+–	+–	+–
0,23		+–	+	+–	+–	+
0,25		+	+	+	+	+
0,28		++	+–	++	++	+
0,33		–	+	+	–	–
0,36		++	+–	++	++	++
0,38	45	++	++	++	++	++
0,41		+–	+	+	+–	+–

4 lentelės tęsinys
Table 4 continued

1	2	3	4	5	6	7
0,47	35	+–	+	+	+–	+–
0,50		++	+	++	++	++
0,54		++	+–	++	++	++
0,61	25	+–	+–	+–	+–	+
0,67		++	+–	++	++	++
0,72	18,4	++	+–	++	++	++
0,75		+	+	+	+	+
0,81	14,4	+	+	+	+	+
0,88		+	+	+	+	++

Komponento nusidažymo intensyvumas / *Staining intensity of a component:*

++ stiprus / *strong*, + – vidutinis / *medium*, + silpnas / *weak*,

– komponento nėra / *component absent*

Motininėje *T. pratense* formoje komponentai Rf 0,28 ir 0,36 yra labai gerai išreikšti, o *T. diffusum* profilyje jų ryškumas silpnas, taip pat abiejose rūšyse skirtingas Rf 0,54, 0,67 ir 0,72 komponentų nusidažymo intensyvumas.

Vertinant tarprūšinių F_1 ir bekrosinių hibridų sėklų atsarginių baltymų elektroforetinius spektrus, nustatyti trys spektrai: I – turintis *T. pratense* ir *T. diffusum* būdingus komponentus; II – *T. pratense* spektras, papildytas nauju didelės molekulinės masės Rf 0,16 komponentu, kurio nėra tėvinių formų baltymų profiliuose; III – identiškas *T. pratense* spektrui, nors skiriasi atskirų fragmentų nusidažymo intensyvumas. Tarprūšiniuose F_1 hibriduose daugumoje atvejų sutinkamas I, o bekrosiniuose hibriduose – II ir III tipo spektrai. Įvertinus B_1F_2 ($\varnothing T. pratense$) atskirų augalų baltymų spektrus nustatyta, kad 33,3% tirtų individų buvo tapatūs motininei formai, o 66,7 % turėjo papildomą Rf 0,16 fragmentą, t.y. priklausė II tipo spektrui.

Raudonųjų dobilų diploidinės veislės ‘Liepsna’ ir tetraploidinės veislės ‘Vyliai’ baltymų elektroforetiniai spektrai tapatūs. Atlikus grįžtamuosius kryžminimus su dobilais ‘Vyliai’, B_2F_3 ($\varnothing T. pratense$) hibriduose padidėjo individų, turinčių identiškus *T. pratense* baltymų spektrus, skaičius.

Populiacijos B_1F_2 ($\varnothing F_1$) hibriduose pastebėtas individų skilimas, jie pagal morfologinius požymius išsiskyrė į dvi grupes: 1 – panašūs į *T. pratense* ($\approx T. pratense$); 2 – panašūs į *T. diffusum* ($\approx T. diffusum$). Individai, priskiriami 1 grupei, pagal baltymų spektrus tapatūs raudoniesiems dobilams, o 2 grupės individai turėjo *T. diffusum* charakteringą Rf 0,33 komponentą. Linijos B_2F_3 ($\varnothing T. diffusum$) hibridų spektre pakinta kai kurių mažesnės molekulinės masės komponentų nusidažymo intensyvumas ir atsiranda *T. diffusum* rūšiai būdingi komponentai. Į elektroforetinius baltymų tyrimus buvo įtraukta ir bekrosinė populiacija B_2F_6 , pasižyminti padidintu atsparumu dobilų vėžio sukėlėjui. Jos spektre nustatytas Rf 0,16 komponentas, būdingas tik tarprūšiniams hibridams, taip pat mažos molekulinės masės komponentai Rf 0,75-0,88 srityje buvo geriau išreikšti, negu tėvinėse formose.

5 lentelė. *T. pratense* x *T. diffusum* hibridų atsarginių baltymų elektroforetiniai spektrai

Table 5. *Seed protein spectra in T. pratense x T. diffusum interspecific hybrids*

Populiacija <i>Population</i>	Baltymų spektrai / <i>Seed protein spectra</i>		
	I <i>T. pratense</i> ir <i>T. diffusum</i> komponentai <i>T. pratense</i> and <i>T. diffusum</i> components are <i>present</i>	II <i>T. pratense</i> ir nauji komponentai <i>T. pratense</i> and <i>novel components</i> are present	III <i>T. pratense</i> komponentai <i>T. pratense</i> components are <i>present</i>
F ₁	+	–	–
B ₁ F ₂ (♀ <i>T. pratense</i>)	–	+	+
B ₂ F ₃ (♀ <i>T. pratense</i>)	–	+	+
B ₁ F ₂ (♀F ₁)≈ <i>T. diffusum</i>	+	–	–
B ₁ F ₂ (♀F ₁)≈ <i>T. pratense</i>	–	–	+
B ₂ F ₃ (♂ <i>T. diffusum</i>)	+	–	–

+ komponentas yra, – komponento nėra / + *component present*, – *component absent*

Lemiamą reikšmę augalo ir fitopatogeno sąveikoje turi tam tikros baltymų grupės, kurios turi įtakos augalų atsparumą atitinkamiems ligų sukėlėjams /Membre ir kt., 2000/. Testuojant pagal baltymų ekstrahuojamumo kitimą atsparias ir neatsparias fitopatogenui *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. raudonųjų dobilų linijas, nustatyta nevienoda jų reakcija į patogeno poveikį. Atspariuose augaluose nustatytas gebėjimas greitai padaryti nejudrius tirpius baltymus /Jančys, 2004/. Gauti tyrimų rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad bekrosinių hibridų atsparumas fitopatogenui *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. gali sietis su mažos molekulinės masės baltymų komponentais. Šiai prielaidai patvirtinti būtini detalesni tyrimai.

Išvados

1. PO ir SOD elektroforetiniuose spektruose nustatyti *T. pratense* ir *T. diffusum* rūšis ženklinantys komponentai; *T. ambiguum* ir *T. hybridum* – spektrai tapatūs.

2. Tarprūšiniuose *T. pratense* x *T. diffusum* hibriduose nustatyti 2 SOD ir 6 PO elektroforetiniai fermentų spektrai, kurie 96,7-100 % patvirtina F₁ ir 49,6-76,0 % bekrosinių individų hibridinę prigimtį.

3. *T. ambiguum* ir *T. hybridum* dobilų rūšys turėjo skirtingus PGI, GOT, LAP spektrus. Pagal PGI elektroforetinį spektrą patvirtintas 60,8 % tirtų *T. ambiguum* x *T. hybridum* individų hibridiškumas. GOT, LAP spektrai hibriduose tapatūs motininei *T. ambiguum* rūšiai.

4. *T. pratense* ir *T. diffusum* sėklų atsarginių baltymų elektroforetiniuose spektruose nustatyti komponentai Rf 0,19 ir Rf 0,33, savitai ženklinantys šias dobilų rūšis.

5. Tarprūšinių F₁ hibridų baltymų spektre yra abiejų tėvinių rūšių komponentai, patvirtinantys pastarųjų hibridiškumą. Bekrosinių populiacijų B₁F₂ (♀*T.pratense*) ir B₂F₃(♀*T.pratense*) hibridų baltymų spektrai dvejetainiai: 1 – identiški *T. pratense*; 2 – *T. pratense* spektrai, papildyti nauju, nebūdingu tėvinėms formoms, komponentu.

Padėka. Dėkojame Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui (Sutartis su VMSF Nr. T-38/04), parėmusiam šį darbą.

Gauta 2005 02 25

Pasirašyta spaudai 2005 05 26

LITERATŪRA

1. Abberton M.T., Marshall A.H., Williams T.A. et al. Forage quality of *Trifolium repens* L. x *Trifolium nigrescens* Viv. hybrids // Grass and Forage Science. - 2003, vol.58(3), p.295-301
2. Alpatieva N.V., Gubareva N.K. K voprosu ob ispol'zovanii belkovykh markerov v ocenke morozostojkosti ozimoy pšenicy // Agrarnaja Rosija. - 2002, t.3, s.28-31
3. Dabkevičienė G. Embryo culture and micro propagation in clover allopolyploidy // Sodininkystė ir daržininkystė. - 2000, t.5-6, No.19(3)-1, p.375-383
4. Gardinje E., Forde M.B. Identification of cultivars of pasture species by electrophoresis of seed storage proteins // Biochemical identification of varieties. - Leningrad, 1988, p.65-72
5. Hahn H., Schoberlein W. Characterization and identification of *Festulolium* hybrids by electrophoresis of seed proteins // Seed Science and Technology. - 1999, iss.27, p.525-542
6. Haider A.S., El-Shanshoury A.R. Variability of storage proteins and esterase isozymes in *Vicia sativa* subspecies // Biologija plantarum. - 2000, vol.43(2), p.205-209
7. Jančys Z., Vyšniauskienė R. Relation between clover disease resistance and oxalate-induced changes in protein solubility // Žemės ūkio mokslai. - 2004, t.1, p.24-27
8. Johanson E., Svensson G., Tsegaye S. Genotype and environment effects on bread-making quality of Swedish-grown wheat cultivars containing high-molecular-weight glutenin subunits 2+12 or 5+10 // Acta Agricultura Scandinavica, section B, Soil and Plant Science. - 2000, vol.49(4), p.225-233
9. Konarev A.V., Konarev V.G., Gubareva N.K., Peneva T.I. Belki semjan kak markery v rešenii problem genetičeskich resursov rastenij, selekcii i semenovodstva // Citologija i genetika. - 2000, t.34(2), s.91-104
10. Krishnan H.B., Slepser D.A. Identification of tall fescue cultivars by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of seed protein // Crop Science. - 1997, No.37, p.215-219
11. Lange O., Schifino-Wittmann M.T. Isozyme variation in wild and cultivated species of the genus *Trifolium* L.(Leguminosae) // Annals of botany. - 2000, iss.86, p.339-345
12. Malaviya D.R., Roy A.K., Kaushal P. et al. Development and characterization of intraspecific hybrids of *Trifolium alexandrinum* x *T. apertum* using embryo rescue // Plant breeding. - 2004, vol.123, p.536-542

13. Marshall A.H, Michaelson-Yeates T.P.T., Aluka P., Meredith M. Reproductive characters of interspecific hybrids between *Trifolium repens* L. and *T. nigrescens* Viv. // *Heredity*. - 1995, vol.74, p.136-45
14. Marshall A.H., Abberton M.T., Michaelson-Yeates T.P.T., Williams T.A., Rodes I. Quality characteristics of backcross hybrids between *Trifolium repens* L. x *Trifolium ambiquum* Bieb. // *Euphytica*. - 2002, vol.127(1), p.75-80
15. Membre N., Bernier F., Staiger D. et al. Arabidopsis thaliana germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions // *Planta*. - 2000, vol. 211, iss.3, p. 345-354
16. Nekrošas S., Sliesaravičius A., Dapkienė R. Eraičinų ir svidrių hibridinė veislė 'Punia' // *Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI*. - 1995, t.50, p.203-206
17. Nekrošas S., Sliesaravičius A. Įvairiomis kryžminimo kombinacijomis sukurtų tarpgentinių svidrių - eraičinų hibridų tyrimas // *Žemės ūkio mokslai*. - 2004, Nr.3, p.20-27
18. Odoardi M., Delogu C., Cremona R. et al. Identification of subterranean clover cultivars by isozymes anglysis // *Vortrage fur pflanzenzuchtung*. - 2003, vol.59, p.160-163
19. Paplauskienė V. Tarpgentinių eraičinų-svidrių hibridų fermentų ir sėklų prolaminų elektroforetiniai tyrimai // *Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU*. - 1998, t.64, p.166-175
20. Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F. et al. Partical isozyme genetics. - Paris, 1987. - 215 p.
21. Pašakinskienė I. *In vitro* metodas daugiamečių svidrių poliploidams gauti // *Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU*. - 2000, t.70, p.227-234
22. Pašakinskienė I. Culture of embryos and shoot tips for chromosome doubling in *Lolium perenne* and sterile hybrids between *Lolium* and *Festuca* // *Plant breeding*. - 2000, vol.119, p.185-187
23. Przywara L., White D.W.R., Sanders P.M. et al. Interspecific hybridization of *Trifolium repens* with *T. hybridum* using in ovulo embryo and embryo culture // *Annals of botany*. - 1989, vol.64, p.613-624
24. Safonov V.I., Safonova M.N. Issledovanie belkov i fermentov rastenij metodom élektroforeza v poliakrilamidnom gele // *Biochimičeskie metody v fiziologii rastenij*. - Moskva, 1971, s.113-136
25. Starovičova M., Galova Z., Knoblochova H. Identification of glutenin markers in cultivars of three wheat species // *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. - 2003, vol.39, p.51-57
26. Tarakanovas P., Raudonius S. Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas *ANOVA*, *STAT*, *SPLIT-PLOT* iš paketo *SELEKCIJA* ir *IRRISTAT*. - Akademija, 2003. - 58 p.
27. Valizadeh M. Seed storage protein profile of grain legumes grown using SDS-PAGE // *Journal Agriculture Science Technology*. - 2001, vol.3, p.287-292

CHARACTERIZATION OF CLOVER SPECIES AND THEIR INTERSPECIFIC HYBRIDS BY ISOZYMES AND SEED PROTEIN ELECTROPHORETICAL ANALYSIS

V. Paplauskienė, G. Dabkevičienė

Summary

We analysed spectra of peroxidase superoxide dismutase (SOD) and (PO) in clover species and their interspecific hybrids. While comparing *T. pratense* L. and *T. diffusum* Ehrh. species we found specific SOD and PO components, while *T. ambiguum* Bieb. and *T. hybridum* L. spectra were identical. *T. pratense* x *T. diffusum* F₁, B₁F₂ and B₂F₃ hybrids had a complete or partial set of SOD and PO components of parental species which was supplemented by original components occurring only in hybrids. In *T. pratense* x *T. diffusum* F₁ hybrids we detected SOD spectra of two types, which give a significant proof of their hybrid origin. In backcross lines derived from *T. pratense* x (*T. pratense* x *T. diffusum*) crossing, hybridity was confirmed in 49.6 % of individuals, the other plants had a spectrum identical to parent species. When analysing PO polymorphism in F₁ population hybridity was confirmed in 96.7 % of plants, the rest of the individuals had a spectrum identical to that of *T. pratense*. In backcross B₁F₂ and B₂F₃ populations 76.0 % of plants had a spectrum confirming their hybrid nature, the other 24.0 % of clover plants demonstrated only maternal *T. pratense* species spectrum. It was determined that in order to identify *T. pratense* x *T. diffusum* hybrids it is necessary to carry out polymorphism analysis of both isoenzymes SOD and PO.

T. ambiguum and *T. hybridum* species were also assayed for the electrophoretic spectra of the other enzymes: phosphoglucose isomerase (PGI), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), leucine aminopeptidase (LAP). Two PGI spectra were identified in interspecific *T. ambiguum* x *T. hybridum* hybrids, according to which we were able to confirm hybridity for 60.6 % of the individuals tested. LAP and GOT spectra of clover *T. ambiguum* and *T. hybridum* have species-specific components, but according to these spectra interspecific hybrids were identical to the maternal *T. ambiguum* species.

Electrophoretic spectra of *T. pratense* and *T. diffusum* seed storage proteins were found to possess clover species-characteristic components (Rf 0.19 ir Rf 0.33), specifically marking these clover species. Protein spectra of interspecific F₁ hybrids possess protein components of both clover species. *T. diffusum* specific Rf 0.33 component confirms hybridity of the latter. Protein spectra of backcross B₁F₂, B₂F₃ hybrids are of two types: I- identical to *T. pratense*; II- *T. pratense* spectrum, supplemented by a novel Rf 0.16 component non-specific to parental forms.

Key words: clover, interspecific hybrids, isoenzymes, seed proteins, electrophoretical spectra.