POLYMORPHISMUS OF STORAGE PROTEIN GENES IN WHEAT (*T. AESTIVUM* L.) WITH DIFFERENT COLOUR OF KERNEL

Musilová M.[1], Trojan V.[1], Vyhnánek T.[1, 2], Havel L.[1]

[1] Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

[2] CEITEC MENDELU, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: milena.musilova@mendelu.cz

ABSTRACT

Our objective involves characterization of the genetic variability in chosen loci determinating HMW glutenin subunits and searching for the presence/absence T1BL.1RS translocation in collection of wheat genotypes with differentiated kernel pigmentation. The allele identification of loci *Glu-A1*, *Glu-D1* and presence of locus *Sec-1* were realized on the collection of 16 genotypes, the 7 genotypes of wheat with purple pericarp, the 8 genotypes with blue aleuron layer and the one genotype with red pericarp. For the chosen allele detection were used SPLAT (Specific Polymorphic Locus Amplification Test) method and AS-PCR (Allele-Specific PCR). From the partial analysis results loci *Glu-A1*, *Glu-D1* for HMW (High Molecular Weight) glutenin subunits and locus *Sec-1* (rye translocation marker) in 16 wheat genotypes with different colored kernel was in one genotype with purple pericarp (Indigo) detected the occurrence of alleles *Glu-A1b* and *Glu-D1d*, and in three genotypes with blue aleuron layer (UC 66049, RU 440-6 and RU 440-5) was detected occurrence of alleles combinations for HMW glutenin subunits (*Glu-A1a* and *Glu-D1d*). Within the standard wheat with red pericarp, the remaining six genotypes with purple pericarp and the five genotypes with blue aleuron layer was detected allele *Glu-D1d*. Rye translocation *Sec-1* was not detected in any of the analyzed genotypes. From these results we can conclude that genotypes Indigo, UC66049, RU 440-6 and RU 440-5 have a genetic precondition to a good bread-making quality. Study of HMW glutenin subunits of wheat genetic resources collection with differentiated pigmentation is important for selecting strategies by their subsequent use in wheat breeding program.

Key words: HMW glutenin subunits, translocation, wheat

Acknowledgement: This study was supported by project IGA FA MENDELU No. TP 7/2011 and GAČR 204/09/H002. We acknowledge Ing. Petr Martinek (ARI Kroměříž, Ltd.) for seed samples, Petr Sekanina and Bc. Jana Podhorná for running laboratory experiments.

ÚVOD

Jednou z možných cest využití genotypů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) s rozdílným zastoupením přírodních barviv v obilce je rozšíření sortimentu cereálních výrobků. Pšeničná obilka se zvýšeným obsahem přírodních barviv by mohla být vhodná pro výrobu funkčních potravin, které by měly mít kromě prosté výživné hodnoty i příznivý účinek na zdraví konzumenta (El-Sayed, 2003). Technologické využití barevných pšenic je spojeno nejenom s nutností poznání genetické determinace odchylek v zabarvení a následného využití ve šlechtitelském procesu pšenice, ale je spojeno i s poznáním genetické determinace technologické kvality. Geny pro determinující skladbu zásobních proteinů se nachází na odlišných chromozomech jako geny determinující zabarvení obilky. Proteiny přispívají unikátním způsobem k reologii, jež závisí na viskozitě ovlivňované prolaminy rozpustnými v alkoholech a na elasticitě, na níž se podílejí gluteniny, proteiny rozpustné ve slabých roztocích hydroxidů a kyselin (Bushuk a Bekes, 2002). Zásobní bílkoviny jsou zodpovědné za pekařskou jakost a přímo se podílejí na tvorbě lepku. Lepkové bílkoviny můžeme rozdělit na dvě hlavní frakce podle rozpustnosti v roztocích zředěných alkoholů na rozpustné gliadiny a nerozpustné gluteniny. Určující pro sílu lepku jsou zejména vysokomolekulární (HMW – High Molecular Weight) gluteninové podjednotky (Liu a Rathjen, 1996). Detekci HMW podjednotek gluteninů pšenice je možné realizovat na základě elektroforetické analýzy zásobních proteinů obilky pomocí polyakryalmidové elektroforézy (SDS-PAGE) (Černý a Šašek, 1998). Tato metoda byla využita nejenom pro charakterizaci odrůd, ale je i vhodným nástrojem pro charakterizaci genetických zdrojů pšenice seté pro jejich využití ve šlechtitelských programech zaměřených na zlepšování pekařské kvality (Bradová a Štočková, 2010).

Mimo HMW podjednotek gluteninů jsou významným faktorem, který ovlivňuje kvalitu, i prolaminovové proteiny. V rámci šlechtitelského programu pšenice jsou využívaný translokace chromozomů, např. 1BL/1RS – žitná translokace rezistence proti rzím (De Froidmont, 1998), 2BS/2RL – žitná translokace rezistence vůči bejlomorce (Friebe et al., 1990), aj. Z hlediska šlechtění na zlepšenou technologickou kvalitu je nejsledovanějším typem translokace u pšenice, tzv. žitná translokace T1BLS.1RS, která má pozitivní vliv na výnos a rezistenci, ale negativně se odráží na pekařské kvalitě pšenice (Payne et al., 1987). Přítomnost/absenci této translokace lze zjistit pomocí elektroforetické separace zásobních proteinů obilky (Bednář a Vyhnánek, 2004) nebo pomocí DNA markerů (např. RAPD, SPLAT) (Iqbal a Rayburn, 1995; Van Campenhout et al., 1995). Cílem naší práce bylo zhodnotit genetickou variabilitu ve vybraných lokusech determinující HMW podjednotky gluteninů a zjistit přítomnost/absenci translokace T1BL.1RS v kolekci pšenic s diferencovaným zabarvením obilky.

MATERIÁL A METODIKA

Jako experimentální materiál byly použity genotypy pšenice (*Triticum aestivum* L.), jarní a ozimé formy se standardním zabarvením obilky (červeným perikarpem) a genotypy z kolekce genových zdrojů pšenice s nestandardním zabarvením obilky (purpurovým perikarpem a modrým aleuronem) ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o (garant kolekce: Ing. Petr Martinek, CSc.) (Tab.1).

Identifikace alel lokusů *Glu-A1*, *Glu-D1* a přítomnosti lokusu *Sec-1* byla realizována u 16 genotypů pšenice (červeného, purpurového a modrého zabarvení). Koncentrace DNA ve vzorku byla po izolaci zjištěna spektrofotometricky (30 ng.μl^{-1}). Pro detekci jednotlivých alel lokusu *Glu-A1* byly použity primerové kombinace dle Lafiandra et al. (1997) a De Bustos et al. (2000), pro detekci alely *Glu-D1* byl využit protokol D´Ovidio a Anderson (1994) a pro detekci lokusu *Sec-1* primerová kombinace dle Chai et al. (2005). Pro detekci přítomnosti Sec-1 lokusu byla jako pozitivní kontrola využit tritikale odrůda Pawo. Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala: 30 ng templátové DNA, 0,5 U Taq polymerázy (Promega, USA), 1x odpovídající pufr, 7,5 µM každého primeru a 100 µM každého dNTP. Teplotní a časový profil reakce pro PS primery vycházel z práce Vyhnánek et al. (2010) a Chai et al. (2005). Elektroforetická separace probíhala standardně na 1,5 % agarosovém gelu (barvení ethidium bromidem) a výsledné PCR produkty byly srovnány s velikostními standardy (pBR322 DNA *Hae*III /ABgene/ a λDNA/*Eco*471(*Ava*II) /MBI Fermentas/) podle velikosti výsledného amplikonu.

Tab. 1 Přehled analyzovaných genotypů pšenice seté

Barva pletiva	**Genotyp**	**Forma**
červený perikarp	Novosibirskaja 67	jarní
purpurový perikarp	ANK-28A	jarní
	ANK-28B	jarní
	Abissinskaja arrasejta	jarní
	Konini	jarní
	Purple	jarní
	Purple feed	jarní
	Indigo	ozimá
modrý aleuron	UC66049	jarní
	Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen	jarní
	Tschermeks Blaukörniger	jarní
	48M	ozimá
	RU 440-6	ozimá
	RU 440-5	ozimá
	Barevná 9	ozimá
	Barevná 25	ozimá

VÝSLEDKY A DISKUZE

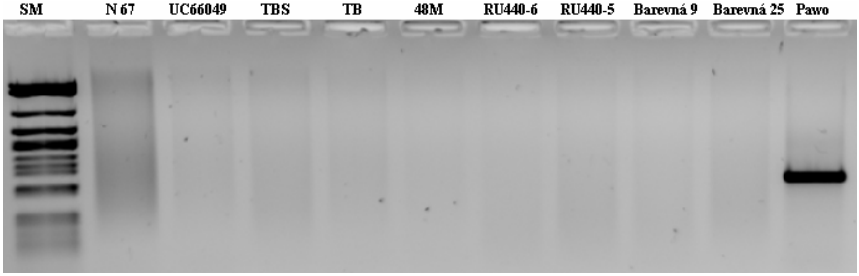
Vysokomolekulární HMW podjednotky pšeničných gluteninů mají průkazný vliv na pekařskou kvalitu pšenice. Tyto podjednotky jsou řízeny kodominantními alelami lokusů *Glu-A1*, *Glu-B1* a *Glu-D1*, jež bývají lokalizovány na dlouhých ramenech 1A, 1B a 1D pšeničných chromozomů (Kolster et al., 1992). Analýzu polymorfizmu HMW podjednotek gluteninů je možné analyzovat elektroforézou zásobních proteinů obilky pšenice. Nevýhodou analýzy zásobních proteinů je nemožnost realizovat selekci vhodných genotypů v raných fázích ontogeneze. DNA markery umožňují realizovat selekci v raných ontogenetických stádiích a nachází stále většího uplatnění i ve šlechtitelských programech pšenice na zlepšování pekařské kvality (Kocourková et al., 2008).

Tab. 2 Přítomnost/absence vybraných alel u genotypů pšenice s různým zabarvením obilek

GENOTYP	*Glu-A1*	*Glu-D1*	*Sec-1*
Červený perikarp			
Novosibirska 67 (N 67)	*b*	*	*
Purpurový perikarp			
ANK-28A	*b*	*	*
ANK-28B	*b*	*	*
Abissinskaja arrasejta	*a*	*	*
Konini	*a*	*	*
Purple	*a*	*	*
Purple feed	*a*	*	*
Indigo	*b*	*d*	*
Modrý aleuron			
UC66049	*a*	*d*	*
Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen (TBS)	*a*	*	*
Tschermaks Blaukörniger (TB)	*a*	*	*
48M	*c*	*	*
RU 440-6	*a*	*d*	*
RU 440-5	*a*	*d*	*
Barevná 9	*c*	*	*
Barevná 25	*c*	*	*

Vysvětlivky: *Glu-A1a* (kóduje Ax1), *Glu-A1b* (Ax2), *Glu-A1c* (AxNull) a *Glu-D1d* (Dx5+Dy10); * - nebyla zjištěna přítomnost

PCR produkty pro alelu *Glu-A1a* byly detekovány u 57 % purpurových genotypů a u 63 % modrých genotypů (Tab. 2). Procentické zastoupení HMW podjednotky gluteninů *Glu* Ax2 (kódovaná alelou *Glu-A1b*) bylo v případě purpurových genotypů 42 %, u modrých genotypů nebyla tato alela zaznamenána. Přítomnost podjednotky *Glu-A1c* byla zjištěna u 38 % modrých genotypů, u purpurových zjištěna nebyla. Podjednotka *Glu-D1d* byla zaznamenána u 14 % purpurových genotypů a u 38 % genotypů modrých. Alela *Glu-D1d* determinující vysokomolekulární podjednotku gluteninů 1D 5x+10y je podle predikčních hodnot stanovených Paynem et al. (1988) markerem dobré pekařské kvality. Dotlačil et al. (2002) zjistili v rámci analýzy HMW podjednotek pšenice její nižší výskyt u starých a krajových odrůd v porovnání s moderními odrůdami. Pro co nejpřesnější predikci technologické kvality je nutné zmapovat výskyt dalších alel v lokusech *Glu-B1* a *Glu-D1* (Lukow et al., 1989). Dalším významný genetickým faktorem ovlivňující kvalitu je přítomnost/absence translokace T1BL.1RS determinující lokus *Sec-1* vyskytující se na pšeničném B chromozomu, který se pozitivně projevuje na výnosu, avšak na pekařské kvalitě se podílí negativně. Při analýzách genotypů s různým zabarvením obilky nebyl tento lokus detekován (Obr. 1).



Obr. 1 Ukázka detekce přítomnosti/ absence lokusu Sec-1 u genotypů pšenice s modrým aleuronem na agarósovém gelu

ZÁVĚR

Z výsledků analýz lokusů *Glu-A1*, *Glu-D1* pro HMW gluteninových podjednotek a lokus *Sec-1* (marker žitné translokace) u 16 genotypů pšenice s různě zabarvenou obilkou byl u jednoho genotypu s purpurovým perikarpem (Indigo) detekován výskyt alel *Glu-A1b* a *Glu-D1d*, a u tří genotypů s modrým aleuronem (UC 66049, RU 440-6, RU 440-5) byl zaznamenán výskyt kombinace alel pro HMW gluteninové podjednotky (*Glu-A1a* a *Glu-D1d*). U pšenice se standardním zabarvením obilky, zbylých šesti genotypů s purpurovým perikarpem a pěti genotypů s modrým aleuronem nebyla zjištěna přítomnost alely *Glu-D1d*. Žitná translokace *Sec-1* nebyla detekována u žádného z analyzovaných genotypů. Z těchto výsledků bychom mohli usoudit, že genotypy Indigo, UC66049, RU 440-6 a RU 440-5 mají genetický předpoklad k dobré pekařské kvalitě. Studium HMW podjednotek gluteninů u kolekce genetických zdrojů pšenice s diferencovaným zabarvením je důležité pro volbu strategie při jejich následném využití ve šlechtitelském programu pšenice.

LITERATURA

Bednář J., Vyhnánek T. (2004) Detection of the varietal purity in sample of harvested wheat

and triticale grains by prolamin marker. Pant Soil Environment. 49 (3): 95–98.

Bradová J., Štočková L. (2010) Evaluation of winter wheat collection in terms of HMW- and LMW-gluteninsubunits. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 46 (Sp. Issue): 96-99.

Bushuk W., Bekes F. (2002) Contribution of protein to flour duality. Proceedings of Novel Raw Materials, Technologies and Products—New Challenge for the Quality Control26–29 May 2002. ICC 2002 Conference, Budapest 2002, 14–19.

Chai J.F., Liu X., Jia J.Z. (2005) Homoelogous cloning of omega-secalin gene family in a wheat 1BL/1RS translocation. Cell Research, 15 (8): 658-664.

Černý, J., Šašek, A. (1996) Bílkovinné signální geny pšenice obecné. ÚZPI Praha, 62 s.

De Bustos A., Rubio P., Jouve N. (2000) Molecular characterization of the inactive allele of the gene Glu-A1 and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenins of wheat. Theoretical and Applied Genetics, 100 (7): 1085-1094.

De Froidmont D. (1998) A Co-dominant Marker for the 1BL/1RS Wheat.Rye Translocation via Multiplex PCR. Journal of Cereal Science, 27: 229-232

Dotlačil, L., Gregová, E., Hermuth, J., Stehno, Z., Kraic, J. (2002) Diversity of HMW-*Glu* Alleles and Evaluation of their Effects on some Characters in Winter Wheat Landraces and Old Cultivars. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 38: 109-116.

D´Ovidio R, Anderson O. D. (1994) PCR analysis to distinguish between alleles of member of a multigene family correlated with bread-making quality. Theoretical and Applied Genetics, 88 (6-7): 759-763.

El-Sayed M., Anděl-Aal, Hucl P. (2003) Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:2174-2180.

Friebe B., Hatchett J. H., Sears R. G. and Gill B. S.(1990) Transfer of Hessian fly resistance from 'Chaupon' rye to hexaploid wheat via a 2BS/2RL wheat-rye chromosome translocation. Theoretical and Applied Genetics 79 (3): 385-389.

Iqbal M.J., Rayburn A.L. (1995) Identification of the 1RS rye chromosomal segment in wheat RAPD analysis. Theoretical and Applied Genetics 91 (6-7): 1048-1053.

Kocourková Z., Bradová J., Kohutová Z., Slámová L., Vejl P., Horčička P. (2008) Wheat breeding for the improved bread-making quality using PCR based markers of glutenins. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 44 (3): 105-113.

Kolster P., Kretchting C.F., Van Gelder W.M.J. (1992) Qualification of individual high-molecular-weight glutenin subunits of wheat using SDS-PAGE and scanning densitometry. Journal of Cereal Science, 15: 49-61.

Lafiandra D., Tucci G. F., Pavoni A., Turchetta T., Margiotta B. (1997) PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex Glu-A1 locus in durum and bread wheat. Theoretical and Applied Genetics, 94 (2): 235-240.

Liu CY, Rathjen AJ (1996)Association of high and low molecular weight glutenin subunits with dough strength in durum wheats (*Triticum turgidum* ssp. *turgidum* L. conv. *durum* (Desf.)) in southern Australia. Australian Journal of Experimental Agriculture, 36 (4) 451 – 458.

Lukow, O.M., Payne, P.I. and Tkachuk, R. (1989) The HMW glutenin subunit composition of Canadian wheat cultivars and their association with bread-making quality. Journal of the Science of Food and Agriculture 46: 451-460.

Payne P.I. , Holt L.M., Krattiger A.F., Carrillo J.M. (1988) Relationships between seed quality characteristics and HMW glutenin subunit composition determined using wheats grown in Spain. Journal of Cereal Science, 7 (3): 229-235.

Payne P.I., Nightingale M.A., Krattiger A.F., Holt, L.M. (1987) The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. Journal of the Science of Food and Agriculture 40: 51-65.

Van Campenhout S., Vanderstappen J., Sagi L., Valckaert G. (1995) Locus-specific primers for LMW glutenin genes on each of the group 1 chromosome of hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics 91 (2): 313-319.

Vyhnánek, T., Halouzková, E., Trojan, V., Martinek, P. (2010) Detekce alel pro vysokomolekulární podjednotky gluteninů u tritikale pomocí DNA markerů. Potravinárstvo [online], 4 (supplement): 545-551.