

CHARACTERISTICS OF WHEAT GENOTYPES USING HIGH MOLECULAR WEIGHT SUBUNITS GLUTENIN ALLELE

CHARAKTERISTIKA GENOTYPŮ PŠENICE POMOCÍ ALEL VYSOKOMOLEKULÁRNÍCH PODJEDNOTEK GLUTENINŮ

Kocourková Z., Vejl P.

Katedra genetiky a šlechtění, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6 – Suchbát, Česká republika.

E-mail: kocourkovaz@af.czu.cz, vejl@af.czu.cz

ABSTRACT

Baking quality is a key factor in the development of new wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties and is namely connected with the quantity and the quality of proteins in wheat kernel, from which the gluten complex is made. The baking quality is mainly influenced by HMW subunits of glutenins (high molecular weight glutenins), but LMW subunits of glutenins and gliadins have also consideration for the baking quality. The genes of HMW glutenins are located on the long arm of the group of chromosomes 1. Good or poor wheat bread-quality is associated with 2 allelic pairs at *Glu-D1* complex locus, designated *1Dx5-1Dy10* and *1Dx2-1Dy12*, respectively. The aim of this paper is detection of the allelic composition at *Glu-D1* locus in 56 genotypes of the common wheat by SPLAT method using 2 markers. The reliability of these markers was verified by comparison of the results.

Keywords: wheat, baking quality, HMW, marker, SPLAT

ABSTRAKT

Při šlechtění nových odrůd pšenice (*Triticum aestivum* L.) je pekařská jakost klíčovým faktorem a je významně spojována především s obsahem a kvalitou bílkovin v pšeničném zrně, které vytváří lepkový komplex. Tato kvalita je ovlivněna zejména vysokomolekulárními podjednotkami gluteninů (HMW), ačkoli pekařskou jakost ovlivňují i nízkomolekulární podjednotky gluteninů a gliadiny. Geny pro vysokomolekulární podjednotky gluteninů se nacházejí na dlouhém rameni skupiny 1 chromozomů. Dobrá nebo špatná pekařská jakost je spojena s dvěma alelickými páry na *Glu-D1* lokusu a to *1Dx5-1Dy10* a *1Dx2-1Dy12*. Cílem práce byla detekce alelického složení v lokusu *Glu 1D* u 56 genotypů pšenice obecné, a to metodou SPLAT pomocí 2 markerů a porovnáním výsledků zjistit spolehlivost těchto markerů.

Klíčová slova: pšenice, pekařská jakost, HMW, marker, SPLAT

ÚVOD

Pšenice je jednou z nejdůležitějších zrnin na světě a její pekařská jakost je znak se vzrůstající důležitostí, protože definuje využití a prodejnost pšeničných výrobků.

V případě vhodnosti k pekařskému zpracování, tedy pro výrobu kynutých těst, je pekařská jakost dána především obsahem a kvalitou bílkovin v pšeničném zrně, ze kterých se vytváří lepkový komplex.

Podstatnou část lepku tvoří zásobní bílkoviny, proto se gliadin a glutenin označují jako lepkové bílkoviny, přičemž gliadin je považován za nositele tažnosti, kdežto glutenin pružnosti a bobtnavosti lepku (Ingr et al., 1993).

Galili *et al.* (1983) lokalizovali geny gluteninů s VMH v dlouhých ramenech chromozómů 1A, 1B a 1D. Naproti tomu gliadinové geny byly zjištěny v krátkých ramenech stejných chromozómů 1A, 1B a 1D. Dobrá nebo špatná pekařská jakost je spojena s dvěma alelickými páry na *Glu-D1* lokusu a to *1Dx5-1Dy10* a *1Dx2-1Dy12* (D'Ovidio et al., 1994). Každý lokus kóduje dva typy vysokomolekulárních podjednotek gluteninů s různou molekulární hmotností. Vysokomolekulární podjednotky s vyšší molekulární hmotností značíme jako typ x a podjednotky s nižší molekulární hmotností značíme jako podjednotky y. Tyto podjednotky existují v těsné genové vazbě a jsou často udávány jako x + y pár. (Harberd et al., 1986). Nezávislá zkoumání zjistila těsnou asociaci mezi alelickým párem HMW x5+y10 na lokusu *Glu D1* a lepší pekařskou jakostí, zatímco naopak alelický pár HMW x2+y12 pekařskou jakost zhoršuje.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je dnes jednou z nejpoužívanějších technik molekulární biologie je to rychlá a nedestruktivní metoda, která je efektivní alternativou ke standardním procedurám užívaným při selekci pšenice s dobrou pekařskou jakostí (Ahmad, 2000). SPLAT (Specific Polymorphic Locus Amplification Test) představuje původní typ PCR, kdy dochází k amplifikaci dvěma primery definovaného lokusu. Výhody metody spočívají v poměrně velké rychlosti analýz, v nepoužívání radioizotopů a v malém množství výchozí genomové DNA. Nevýhoda spočívá v obtížném získávání správných sekvencí primerů (Gale et al., 1992).

MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál

Pro molekulární analýzy bylo použito 56 genotypů pšenice ozimé (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$ chromozómů, genom AABBDD). Analyzované vzorky byly získány z Genové banky VÚRV Praha – Ruzyně.

Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna ve fázi prvního pravého listu pomocí GenElute Plant Genomic DNA Kit od firmy Sigma. Kvalita (vysokomolekularita) izolované DNA byla ověřena v 1% agarozovém gelu pomocí elektroforetické separace na horizontální elektroforéze od firmy Bio Rad (USA). Tímto způsobem vyizolovanou DNA je možno ihned použít pro následné zpracování metodami molekulární genetiky.

Stanovení polymorfismu DNA

Přítomnost alely *Glu 1D 5+10* byla detekována metodou SPLAT v termocykleru T-Gradient od firmy Biometra (SRN), optimalizovanou podle metodiky D' Ovidia a Andersona (1994) za použití dvou primerů F 5' GCC TAG CAA CCT TCA CAA TC 3' a R 5' GAA ACC TGC TGC GGA CAA G 3'. Přítomnost alely *Glu 1D 2+12* byla rovněž detekována metodou SPLAT v termocykleru T-Gradient od firmy Biometra (SRN), F 5' GTT GGC CGG TCG GCT GCC ATG 3' a R 5' TGG AGA AGT TGG ATA GTA CC 3' (Smith et al., 1994).

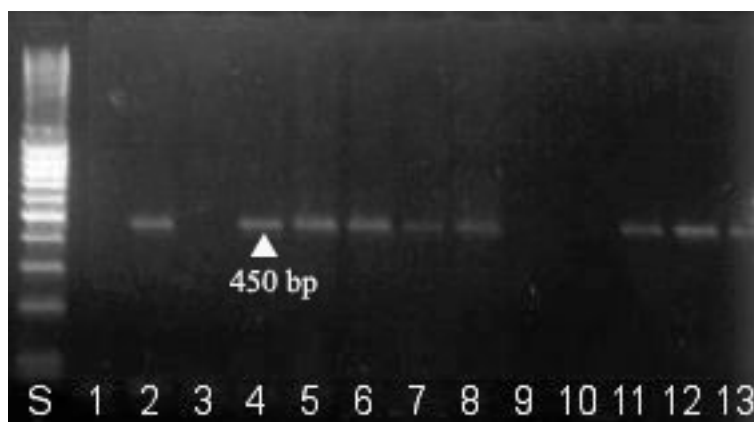
Na termocykleru T-Gradient byl použit PCR program zahrnující 30 cyklů. Teplotní a časový profil SPLAT reakce: 1x (94 °C, 180 s), 30x (94 °C 60 s, 63 °C 45 s, 72 °C 60 s) a 1x (72 °C 300 s). Pro SPLAT reakci bylo chemické složení 25 µl optimalizováno podle metodiky D' Ovidia a Andersona (1994) následovně: 50 - 100 ng templátové DNA, 25 ng primeru, 1x PCR pufr, 2,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1U *Taq* polymerázy. Reakční směs byla převrstvena 15 µl minerálního oleje.

PCR produkty byly uchovávány při 4°C a separovány pomocí elektroforézy. Agarózový gel (1,5%) byl připraven v 1x TBE pufru a elektroforéza probíhala při 120 V. Vizualizace byla provedena pomocí ethidium bromidu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

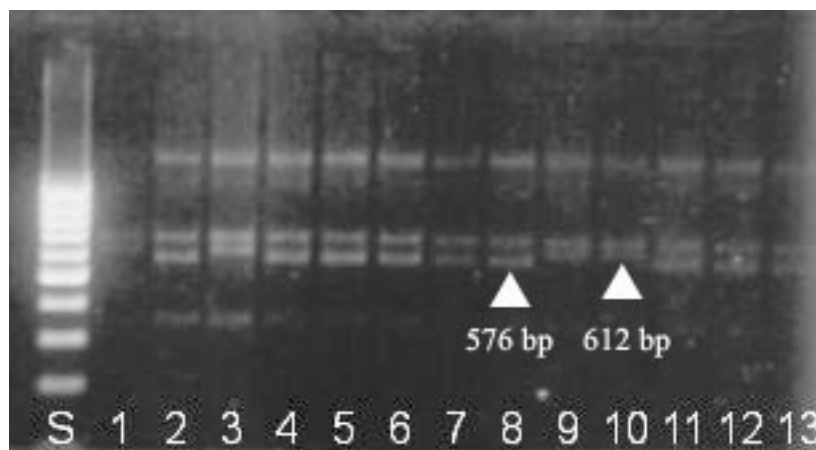
Marker dobré pekařské jakosti, lokus *Glu 1D 5+10* pro detekci metodou SPLAT (D'Ovidio a Anderson, 1994), byl při vizualizaci na agarózovém gelu verifikován produktem o velikosti 450 bp (obr. 1). Tento produkt prokázal přítomnost alely *Glu 1Dx5*. V případě absence tohoto produktu, byla detekována alela *Glu 1Dx2*.

Obr. 1 Elektroforeogram SPLAT produktů detekujících přítomnost *Glu 1Dx5* (S velikostní standard 100bp ladder (Fermentas), 1. SG-S 1199-04, 2. SG-S 179, 3. SG-S 151-03, 4. SG-S 6-03, 5. SG-S 856-02, 6. SG-S 18-02, 7. Vinjet, 8. SW Kadrij, 9. Sirael, 10. Granny, 11. Leguan, 12. Aranka, 13. SG-S 2025-04)



Marker zhoršené pekařské jakosti, lokus *Glu 1D 2+12* po detekci metodou SPLAT. Při získání produktu o velikosti 612 bp na agarozovém gelu byla verifikován alela *Glu 1Dy 12* a produkt o velikosti 576 bp prokázal přítomnost alely *Glu 1Dy 10* (obr. 2)

Obr. 2 Elektroforeogram SPLAT produktů detekujících přítomnost *Glu 1Dy12* (S velikostní standard 100bp ladder (Fermentas), 1. SG-S 1199-04, 2. SG-S 179, 3. SG-S 151-03, 4. SG-S 6-03, 5. SG-S 856-02, 6. SG-S 18-02, 7. Vinjet, 8. SW Kadrij, 9. Siracl, 10. Granny, 11. Leguan, 12. Aranka, 13. SG-S 2025-04)



V tabulce 1 je uvedeno složení lokusu *Glu 1D*. U 56 genotypů pšenice ozimé byla určena přítomnost produktu o velikosti 450 bp, tudíž přítomnost alely *Glu 1Dx5*, a současně přítomnost produktu o velikosti 576 bp, detekující alelu *Glu 1Dy10*. Produkt o velikosti 612 bp, který určuje přítomnost alely *Glu 1Dy12*, současně nevykázal přítomnost produktu 450 bp, tedy detekoval alelu *Glu 1Dx2*. Tímto bylo potvrzeno, že podjednotky HMW gluteninů s vyšší molekulární hmotností (typ x) a podjednotky HMW s nižší molekulární hmotností (typ y) vytvářejí těsnou alelickou vazbu *Glu D1 x5+y10* a *Glu D1 x2+y12*. Vliv těchto alelických párů jako markerů pro pekařskou jakost prokázalo mnoho autorů, jako např. Ahmad, 2000, Campos et al., 2004. Do souboru hodnocených genotypů byla zařazena také odrůda Fiorello, která byla Pognou et al., 1987 pomocí bílkovinných markerů prezentována jako odrůda obsahující alelický pár *Glu D1 x5*+y12*. *Glu 1Dx5** se ale vyznačuje jinou alelickou variantou a D'Ovidio et al., 1994 uvedl, že jimi navržený marker, není schopen tuto alelickou variantu detekovat. Jak vyplývá z výsledků uvedených v tabulce 1, došli jsme v této práci ke stejnému závěru.

Tab. 1 Metodou SPLAT detekovaná přítomnost alel v lokusu *Glu 1D*

Genotyp	1Dx5	1Dy12	Genotyp	1Dx5	1Dy12
Alana	+	-	SG-S 1823-00	+	-
Apache	-	+	SG-S 968-02	-	+
Banquet	+	-	SG-S 71-03	-	+
Bill	-	+	SG-S 91-03	-	+
Karolinum	+	-	SG-S 227-03	+	-
Ilias	+	-	SG-S 1165-03	+	-
Complet	+	-	SG-S 995-04	+	-
Corsaire	-	+	SG-S 1229-04	+	-
Drifter	-	+	SG-S 1323-04	+	-
Ebi	+	-	SG-S 1085-04	+	-
Meritto	-	+	SG-S 2025-04	+	-
Mironovska 808	+	-	Fiorello	-	+
Mladka	-	+	Cheyenne	+	-
Nela	+	-	Aranka	+	-
Rheia	+	-	Leguan	+	-
Rialto	+	-	Granny	-	+
Samanta	+	-	Sirael	-	+
Sandra	-	+	SW Kadrilj	+	-
SG-S 5-02	+	-	Vinjet	+	-
Sparta	+	-	SG-S 18-02	+	-
Sulamit	+	-	SG-S 856-02	+	-
Svitava	+	-	SG-S 6-03	+	-
Šárka	+	-	SG-S 151-03	-	+
Trend	+	-	SG-S 179-03	+	-
Zdar	-	+	SG-S 1199-04	-	+
SG-S 1875-01	+	-	Hartog	+	-
Herman	-	+	Chinese Spring	-	+
CEB0104	-	+	Klasic	+	-

ZÁVĚR

Provedené analýzy u 56 genotypů pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.) prokázaly, že pekařská jakost je spojena s dvěma alelickými páry na *Glu-D1* lokusu a to *1Dx5-1Dy10* a *1Dx2-1Dy12*. Po optimalizaci podmínek SPLAT reakce pro danou laboratoř, byla prokázána vysoká spolehlivost a reproducibilita výsledků. Jedinou možnou překážkou rutinního využití těchto markerů v praxi jsou poměrně vysoké náklady při zařizování laboratoře molekulární genetiky a rovněž samotných analýz.

Poděkování

Práce je podporována výzkumným záměrem MSM 412100002, grantovým projektem QF4190 a grantovým projektem GAČR číslo 521/05/H013 s názvem Pšenice – od genomu ke kvalitě produkce.

LITERATURA

Ahmad M. (2000): Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 892-896.

Campos H., Zuniga J., Rathgeb P., Jobet C. (2004): Selection of chilean wheat genotypes carriers of the HMW glutenin allele Glu-D1 x5 through polymerase chain reaction. *Agricultura técnica*, 64(3): 223-228.

D'Oidio 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: 759-763.

Gale M. D., Witcombe J. R. (1992): DNA markers and marker mediated applications in plant breeding, with particular reference to pearl millet breeding. In: Moss J. P. (ed.): *Biotechnology and crop improvement in Asia*, Patancheru, India, 323-332.

Galili G., Feldman M. (1983): Genetic control of endospermal proteins in wheat. 2. Variation in high molecular weight glutenin and gliadin subunits of *Triticum aestivum* L.. *Theoretical and Applied Genetics*, 66: 77-86.

Harberd N. P., Bartels D., Thompson R. D. (1986): DANN restriction fragment variation in the gene family encoding high-molecular-weight (HMW) glutenin subunits of wheat. *Biochem Genet*, 24: 579-596.

Ingr I. a kolektiv (1993): *Zpracování zemědělských produktů*. VŠZ Brno, 249 s.

Pogna N. E., Mellini F., Dal Belin Poruffo A. (1987): Glutenin subunits of Italian common wheats of good bread-making quality and comparative effects of high-molecular-weight glutenin subunits 2 and 5, 10 and 12 on flour quality. In: Borghi B (ed) *Hard wheat: agronomic, technological, biochemical and genetic aspects*. CEC, , Luxembourg, 53-59 s.

Smith R. L., Schweder M. E., Barnett R. D. (1994): Identification of glutenin alleles in wheat and triticale using PCR-generated DANN markers. *Crop Science* 34:1373-1378.