

IDENTIFIKACE A ROZLIŠENÍ ODRŮD TRITIKALE POMOCÍ POLYMORFIZMU ZÁSObNÍCH BÍLKOVIN OBILKY

Identification and Differentiation of Triticale Varieties Using Polymorphism of Storage Proteins of Braun

Tomáš Vyhnánek, Jan Bednář
Ústav biologie rostlin, MZLU v Brně

Abstract

From the collection of varieties registered in the Czech Republic polymorphism was detected in 11 triticale genotypes (*XTriticosecale* Wittmack., $2n = 6x = 42$, AABBRR) of Czech, Polish, German and French provenance. Samples of grain were obtained from the Central Agricultural Control and Testing Institute in Brno. The PAGE-ISTA (ISTA, 1999) method was used to analyse the polymorphism of prolamins. The SDS-PAGE (Laemmli, 1970) method was used to analyse the polymorphism of high molecular weight of glutenin subunits (HMW).

Key words: *triticale, polymorphism, prolamins, glutenins*

Souhrn

Polymorfizmus zásobních bílkovin obilky byl detekován u 11 odrůd tritikale (*XTriticosecale* Wittmack., $2n = 6x = 42$, AABBRR) české, polské, německé a francouzské provenience. Vzorky osiva byly získány z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Brně. Polymorfizmus prolaminových bílkovin byl detekován metodou PAGE-ISTA (ISTA, 1999) a variabilita podjednotek gluteninů s vysokou molekulovou hmotností metodou SDS PAGE (Laemmli, 1970).

Úvod

Tritikale (*XTriticosecale* Wittmack.) patří mezi plodiny samosprašné s nízkým podílem cizosprašení (4 – 5%). To znamená, že většina pěstovaných odrůd je typu linie nebo směsi izogenních linií. Pro identifikaci a rozlišení odrůd je v současné době k dispozici mnoho metod, např. morfologická charakteristika, biochemické markery především bílkoviny a jejich různé izoenzymové varianty, molekulární (DNA) markery atd. Naše pracoviště se dlouhodobě zabývá detekcí polymorfizmu zásobních bílkovin zrna u obilovin. Gluteninové bílkoviny se vyznačují nižším stupněm polymorfizmu v porovnání s prolaminovými bílkovinami, což je dáno nižším počtem determinujících lokusů (Vyhnánek a Bednář, 2003). Společně se dají využít jako velmi významný genetický marker agronomicko-technologických znaků a vlastností, především pekařské kvality (Šašek et al., 1998). V porovnání s dalšími markery genetické variability mají mnoho výhod. Oproti izoenzymům se vyznačují menší závislostí na podmínkách vnějšího prostředí a nezávisí na ontogenetickém stadiu rostliny. Dalšími markery, jejichž použití nabývá stále většího významu, jsou DNA markery. Tyto metody jsou však, v porovnání s detekcí polymorfizmu zásobních bílkovin zrna, finančně velmi náročné na materiálové a přístrojové vybavení. Vzhledem k těmto aspektům je pro detekci variability odrůd obilovin právě polymorfizmus zásobních bílkovin velmi vhodný.

Cílem naší práce bylo rozlišení a identifikace odrůd tritikale registrovaných v České republice pomocí prolaminových bílkovin a gluteninů s vysokou molekulovou hmotností (VMH).

Materiál a metodika

Analýza polymorfizmu prolaminových a gluteninových bílkovin obilky byla provedena u 10 ozimých odrůd (Disco, Lamberto, Kitaro, Kolor, Marko, Modus, Presto, Sekundo, Ticino, Tricolor) a 1 jarní odrůdy (Gabo) tritikale (*XTriticosecale* Wittmack., $2n=6x=42$, AABBRR) registrovaných v České republice (tab. 1).

Tab. 1: Genetická interpretace podjednotek gluteninů s VMH u tritikale

Odrůda	1A	1B	Glu skóre
Gabo	2*	7+8	6
Disco	1	7+8	6
Lamberto	0	7+8	4
Kitaro	1 a 1/2*	7+8	6/6
Kolor	0	7+8	4
Marko	1	7+8	6
Modus	0	6+8	2
Presto	2*	7+8	6
Sekundo	2* a 1/2*	7+8	6/6
Ticino	2*	7+8	6
Tricolor	2*	7+8	6

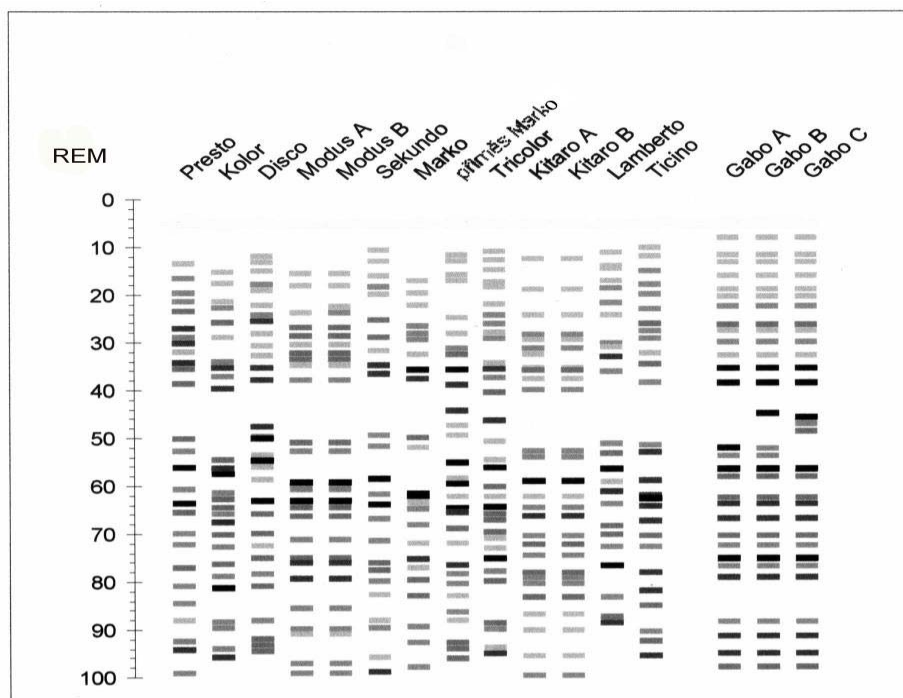
Směsné vzorky osiva byly získány z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, zkušební stanice Hradec nad Svitavou od Ing. Františka Beneše ze sklizně 2002 a 2003. Elektroforetická analýza prolaminových bílkovin byla realizována metodou PAGE ISTA (ISTA, 1999), VMH podjednotek gluteninů dle metodiky SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Pro analýzy bylo použito 22 náhodně vybraných zrn. Každé zrn bylo analyzováno zvlášť. Výsledné elektroforeogramy byly kvalitativně a

kvantitativně vyhodnoceny. U prolaminových bílkovin byl vypočten Diceho podobnostní koeficient a zhotoven dendrogram pomocí software Bio 1D++. Gluteniny s VMH byly geneticky interpretovány pomocí katalogu podjednotek gluteninů s VMH pro pšenici (Payne a Lawrence, 1983).

Výsledky a diskuse

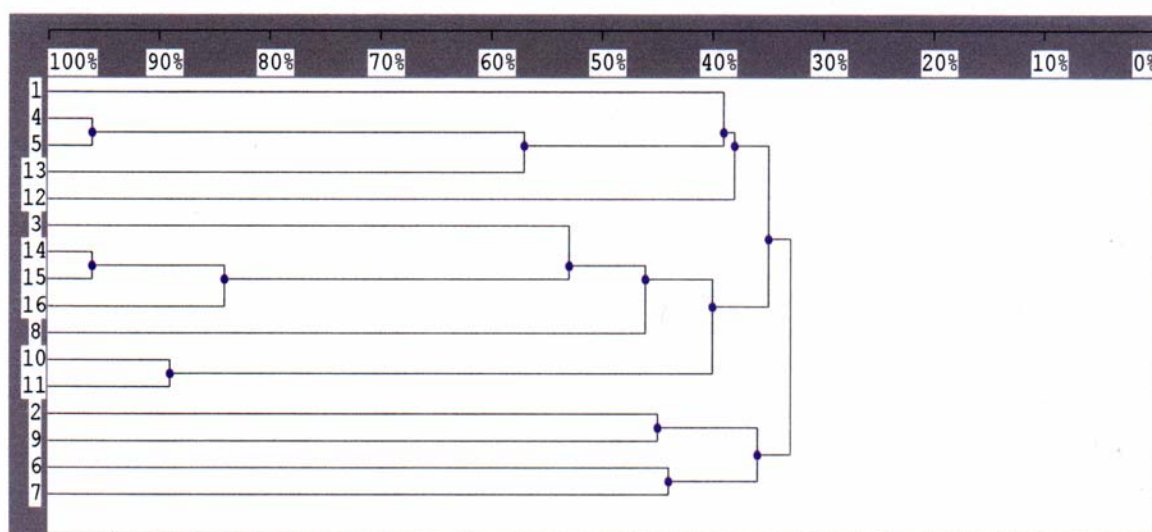
Metakosky et al. (2000) využili prolaminové bílkoviny pro detekci variability u 100 registrovaných odrůd pšenice za posledních 40 let ve Španělsku. V našem případě se podařilo všech 11 analyzovaných odrůd tritikale v obou letech vzájemně rozlišit pomocí polymorfizmu prolaminových bílkovin obilky (obr. 1).

Obr. 1: Prolaminová spektra odrůd tritikale



Výskyt odrůd s uniformním prolaminovým spektrem a genotypů s přítomností dvou a více sesterských prolaminových linií závislých na ročníku byl zaznamenán např. u pšenice, ječmene (Černý, Šašek, 1998) a tritikale (Vyhnánek, Bednář, 2003). U 8 ozimých odrůd tritikale (Presto, Kolor, Disco, Sekundo, Marko, Tricolor, Lamberto a Ticino) bylo zjištěno uniformní elektroforetické prolaminové spektrum a jedná se tudíž o jednoliniové odrůdy (obr. 1). U zbývajících genotypů byl detekován výskyt dvou až tří prolaminových spekter s různým procentickým zastoupením v závislosti na roku. V našem případě rozdíl v procentickém zastoupení nepřesahoval $\pm 6\%$. Elektroforetická spektra byla v obou letech identická a nebyla tedy ovlivněna ročníkem. Dvě prolaminová spektra byla v obou letech detekována u odrůd Modus a Kitaro. Na základě Diceho podobnostních koeficientů a dendrogramu je zřejmé, že se jedná o sesterské prolaminové linie (obr. 2). Naopak v případě odrůdy Marko, kde byla také zjištěna dvě prolaminová spektra v roce 2003, lze na základě Diceho podobnostního koeficientu (0.38) usuzovat, že se jedná o příměs cizího genotypu ve vzorku osiva. Pro příměs neznámého genotypu byl charakteristický gliadinový blok *Gld 1B3*, který je markerem žitné translokace T1BL.1RS, genu *Sr31* rezistence ke rzi travní, vyšší zimovzdornosti a nižší pekařské kvality u pšenice. Tato příměs byla detekována jen v prvním roce a s největší pravděpodobností se jedná o genotyp hexaploidní pšenice seté. U odrůdy jarního tritikale Gabo byla v roce 2003 detekována tři sesterská prolaminová spektra a v roce 2004 dvě sesterská prolaminová spektra (absence linie C). Prolaminové spektrum odrůdy Gabo, jediné jarní odrůdy tritikale registrované v ČR, je na základě Diceho podobnostních koeficientů a dendrogramu nejvíce podobné ozimé odrůdě Disco.

Obr. 2: Dendrogram podobnosti prolaminových spekter tritikale zhotovený pomocí software Bio 1D++ (Jaccardův koeficient, $P=99\%$).



Vysvětlivky: 1 – Presto, 2 – Kolor, 3 – Disco, 4 – Modus A, 5 – Modus B, 6 – Sekundo, 7 – Marko, 8 – příměs odrůdy Marko, 9 – Tricolor, 10 – Kitaro A, 11 – Kitaro B, 12 – Lamberto, 13 – Ticino, 14 – Gabo A, 15 – Gabo B, 16 – Gabo C.

Elektroforetická spektra prolaminů byla v obou letech identická a nebyla tedy ovlivněna ročníkem, čímž byly potvrzeny výsledky mnoha autorů.

Podjednotky gluteninů s vysokou molekulovou hmotností se vyznačují nižším stupněm polymorfismu v porovnání s prolaminovou frakcí zrna tritikale (Vyhnánek a Bednář, 2000). Na chromozomu 1A byly detekovány tři alely v homozygotním stavu 0 (27%), 1 (27%), 2* (45%) (tab. 1). U odrůd Kitaro a Sekundo byla zjištěna u dvou zrn heterozygotní konstituce 1/2*. Na chromozomu 1B tritikale dominoval výskyt klasteru *Glu 1B 7+8* (91%). Jen u odrůdy Modus byl detekován gluteninový blok *Glu 1B 6+8* (9%). Byla vypočtena průměrná až nízká hodnota Glu skóre, kdy byla nejvyšší bodová hodnota 6 (Gabo, Disco, Kitaro, Marko, Presto, Sekundo, Ticino a Tricolor), 4 (Lamberto a Kolor) a nejnižší 2 (Modus). Vypovídací schopnost Glu skóre u tritikale je výrazně ovlivněna použitím

bodových hodnot Glu skóre pro pšenici setou (*Triticum aestivum* L.), tzn. absenci genomu D pšenice a přítomností genomu R žita u tritikale. Proto se jeví nezbytným zjištění vztahu mezi technologickou kvalitou tritikale a genetickou konstitucí polymorfizmu gluteninů s VMH.

Závěr

V práci jsou prezentovány výsledky analýz polymorfizmu prolaminových zásobních bílkovin obilky u 11 odrůd tritikale registrovaných v ČR. Na základě potvrzeného polymorfizmu prolaminových bílkovin je možné analyzované odrůdy rozlišit a identifikovat. Byla ověřena možnost využití polymorfizmu zásobních bílkovin obilky pro stanovení odrůdové pravosti a čistoty tritikale. Dále jsou prezentovány výsledky analýz polymorfizmu podjednotek gluteninů s VMH. Na základě realizované genetické interpretace jednotlivých alel byly vytvořeny pro jednotlivé odrůdy tritikale vzorce gluteninových alel a byla vypočtena hodnota Glu skóre. Bodové hodnoty Glu skóre mají pouze orientační vypovídací schopnost, vzhledem k absenci D chromozomů a přítomnosti R chromozomu žita v genomu tritikale, protože dosud nebyl experimentálně zjištěn vztah mezi hodnotou Glu skóre tritikale a pekařskou kvalitou.

Literatura

- Černý, J., Šásek, A. (1996): ÚZPI, Praha: 62 s.
ISTA (1999): International Rules for Seed Testing: 41-43 a 252-254.
Laemli, V. K. (1970): Nature, 227: 680-685.
Metakovsky E. V., Gomes M., Vazquez J. F., Carrillo J. M. (2000): Plant Breed., 119: 37-42.
Payne, P. I., Lawrence, G. J. (1983): Cereal Res. Commun., 11: 29-35.
Šásek A., Černý J., Bradová J. (1998): Czech J. Genet. Plant Breed., 34: 95–101.
Vyhnanek, T., Bednář, J. (2003): Plant Soil Environ., 49, 3: 95-98.

Práce vznikla za finanční podpory projektu GA ČR č. 521/03/P173.

Kontaktní adresa autorů: Ing. Tomáš Vyhnanek, Ph.D., Doc. Ing. Jan Bednář, CSc., Ústav biologie rostlin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, tel.: +420 545 133 185, e-mail: vyhnanek@mendelu.cz