

VYUŽITÍ BIOCHEMICKO-GENETICKÝCH MARKERŮ PRO DETEKCI PEKAŘSKÉ JAKOSTI PŠENICE

Detection of the Bread-Making Quality of Wheat Using Biochemical-Genetics Markers

Zuzana Kocourková¹, Tomáš Vyhnánek², Zuzana Kohutová¹, Hana Vlastníková¹

¹ Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze

² Ústav biologie rostlin, MZLU v Brně

Abstract

The goal of the work has been to detect a bread-making quality of twelve varieties of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with a different technological quality, by using a stock protein polymorphism and DNA polymorphism. Locus *Glu 1D 5+10* and rye translocation 1BL.1RS was used as markers of bread-making quality. Locus *Glu 1D 5+10* has a significant influence on a higher bread-making quality, being detected by SPLAT method. On the contrary, presence of the rye translocation 1BL.1RS was used as the poor bread - making quality marker, being detected by separation of stock protein using method PAGE-ISTA and method RAPD.

Key words: *wheat, bread-making quality, Glu 1D 5+10, rye translocation, SPLAT, RAPD, PAGE-ISTA*

Souhrn

Cílem práce bylo pomocí polymorfismu zásobních bílkovin a DNA polymorfismu detekovat pekařskou jakost dvanácti odrůd ozimé pšenice (*Triticum aestivum* L.). Tyto vybrané odrůdy ozimé pšenice se vyznačovaly rozdílnou technologickou jakostí. Jako markery pekařské jakosti byla vybrána alela *Glu 1 D5+10* a žitná translokace 1BL.RS. Alela *Glu 1D5+10* má významný vliv na vyšší pekařskou jakost, byla detekována metodou SPLAT. Na druhou stranu přítomnost žitné translokace 1BL.1RS byla použita jako marker horší pekařské jakosti, byla detekována za použití elektroforetické separace bílkovin a pomocí metody RAPD.

Úvod

Soubor specifických vlastností každé odrůdy rozhoduje o jejím využití. V zájmu výrobců osiv a sadby i v zájmu pěstitelů, zpracovatelského průmyslu a obchodu je proto používat jen správně zvolené a spolehlivě určené odrůdy.

Odrůda je v současné době u většiny plodin často velice úzce specializovaný soubor jedinců, jejichž genotyp je předurčen pro přesně definované agrotechniky, pěstební podmínky nebo zpracovatelské technologie. Proto i tyto oblasti požadují určitou možnost genetické kontroly vyrovnanosti a pravosti nejen u množitelského materiálu, ale i u výsledné produkce. Odlišitelnost, vyrovnanost a stálost odrůdy však nejsou pouze vizitkou kvalitní práce šlechtitelů a množitelů odrůd, ale jsou rovněž důležitými faktory pro agronomy, zpracovatele i konzumenty (Vejl et al., 2002).

Dosud používané metody k identifikaci odrůd zemědělských plodin a ostatních pěstovaných rostlin jsou dlouhodobé a neekonomické. U mnoha plodin je rozlišení odrůd v podobě semen, či sadby podle morfologických znaků velmi obtížné, v mnoha případech zcela nemožné. Identifikace odrůd pomocí vegetačních zkoušek je časově velmi náročná.

Proces šlechtění obecně představuje postup, při kterém jsou z vysokého počtu genotypů výchozího materiálu vybírání (selektováni) jedinci se zajímavým genotypem. Čím dříve, spolehlivěji a přesněji je

šlechtitel schopen tento genotyp rozpoznat, tím je proces tvorby nových odrůd a plemen rychlejší. Rychlost tvorby odrůd a plemen s aktuálně významnými vlastnostmi má důležitý vliv na ekonomiku šlechtitelského procesu (Vejl, 1997). Pro urychlení a zefektivnění šlechtění nových odrůd jsou využívány genetické markery nazývané jako tzv. MAS markery (Marker Assisted Selection).

Literární přehled

Na první místo mezi obilovinami stavíme pšenici, která společně s rýží a kukuřicí zabezpečuje výživu převážné části lidstva na naší planetě. Z hlediska potravinářského průmyslu jsou nejdůležitější požadavky na kvalitu zrna. Pekařskou jakostí pšeničného zrna, či jeho mouky se rozumí schopnost poskytnout pečivo s požadovanou jakostí. Jakostní pečivo se má vyznačovat zejména maximálním objemem, kyprou, pružnou a jemně pórovitou střídkou, vybavenou dostatečně tlustou kůrkou a příjemnou chutí a vůní (Černý a Šašek, 1996).

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.

Kromě vnějších vlivů (ročník, hnojení, agrotechnika atd.) je pekařská jakost determinována také genotypem pšenice. Z tohoto důvodu je nezbytná práce šlechtitelů na tvorbě nových a výkonnějších odrůd. Rychlost tvorby odrůd, které budou vyhovovat požadavkům pěstitelů a zpracovatelů, ovlivňuje velmi významně ekonomiku šlechtitelského procesu. Zde se nejvíce uplatňuje včasná selekce genotypů s vhodnými vlastnostmi a znaky pomocí MAS markerů. Pokrok v oblasti biochemie a molekulární biologie umožnil pro predikci pekařské jakosti pšenice využít markery založené na polymorfismu zásobních bílkovin a markery založené na polymorfismu DNA. Aplikace těchto markerů se v současnosti stává nezbytnou součástí procesu tvorby nových odrůd.

Gluteninový alelický pár *Glu 1D 5+10* významně ovlivňuje vyšší pekařskou jakost, proto byl vybrán jako marker vyšší pekařské kvality.

Žitná translokace 1BL.1RS je markerem zhoršené pekařské kvality, která se do genomu pšenice dostala přenesením části krátkého ramene 1R chromozomu žita na dlouhé rameno 1B chromozomu pšenice za účelem zvýšení odolnosti ke rzi travní (*Puccinia graminis*). Translokovaný segment žitného chromozomu 1R nese nejen gen odolnosti ke rzi travní *Sr 31*, ale i sekalinové geny, které výrazně zhoršují jakost pšeničného lepku.

Metodika

Biologický materiál

Pro molekulární a biochemické analýzy bylo použito 12 odrůd pšenice ozimé (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$ chromozomů, genom AABBDD). Jednalo se o odrůdy Apache, Astella, Athlet, Brea, Ebi, Estica, Livia, Mona, Niagara, Rialto, Sida a Sparta. Analyzované vzorky byly získány z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) v Brně.

Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna ve fázi prvního pravého listu pomocí DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen. Takto 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 T3 se třemi na sobě nezávislými kombibloky od firmy Biometra, 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 GCA CAA 3'. Primery byly nasyntetizovány v Laboratoři funkční genomiky a proteomiky na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

Složení 25 µl reakce bylo podle oficiální metodiky uváděné D' Ovidiem a Andersonem (1994). Teplotní a časový profil SPLAT reakce: 1x (94 °C, 60 s), 30x (94 °C 60 s, 63 °C 45 s, 72 °C 60 s) a 1x (72 °C 600 s).

Přítomnost žitné translokace 1BL.1RS u pšenice byla dokazována metodou RAPD, která byla optimalizovaná podle metodiky Iqbala a Rayburna (1995) za použití jednoho primeru OPJ07 5' CCT CTG GAC A 3'. Primer OPJ07 byl stejně jako primery F a R nasyntetizován v Laboratoři funkční genomiky a proteomiky na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

Na 1 reakci bylo připraveno 50 µl reakční směsi, která byla připravena podle Iqbala a Rayburna (1995). Teplotní a časový profil RAPD reakce: 1x (94 °C 60 s), 40x (94 °C 60 s, 36 °C 60 s, 72 °C 120 s) a 1x (72 °C 600 s).

Stanovení polymorfismu zásobních proteinů pšenice metodou PAGE-ISTA

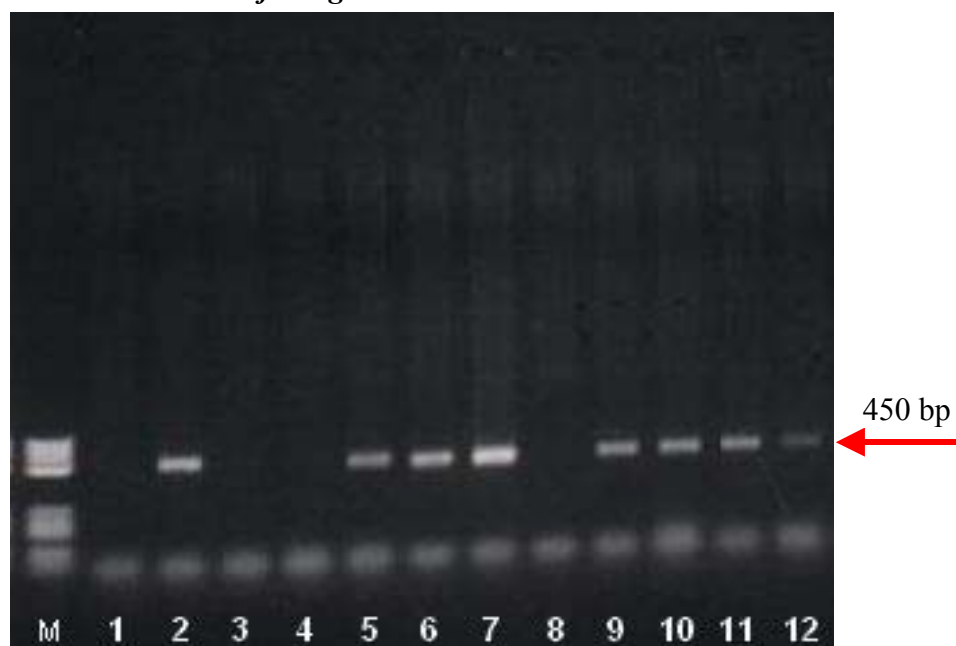
Pro detekci polymorfismu prolaminových bílkovin (gliadinů) obilky byla využita vertikální polyakrylamidová elektroforéza Maxigel firmy Biometra se stabilizátorem napětí EC 135 metodikou PAGE-ISTA dle ČSN 460610. Doba elektroforézy byla stanovena jako dvojnásobek doby potřebné k průchodu indikačního barviva pyronin G dráhou gelu. Separace extrahovaných proteinů na molekulovém síti polyakrylamidového gelu probíhala při konstantním napětí 330 V v první části separace a ve druhé části bylo napětí zvýšeno na 450 V.

V našem případě bylo pomocí polymorfismu gliadinů možno všech 12 genotypů ozimé pšenice navzájem rozlišit a identifikovat.

Výsledky a diskuse

Lokus *Glu 1D 5+10* po detekci metodou SPLAT (D'Ovidio a Anderson, 1994) byl při vizualizaci na agarózovém gelu verifikován produktem o velikosti 450 bp (obr. 1) u odrůd Astella, Athlet, Brea, Ebi, Livia, Mona Niagara a Sparta. Ke stejným výsledkům dospěli za použití SDS-PAGE elektroforézy podjednotek gluteninů s vysokou molekulární hmotností Šásek et al. (2000).

Obrázek 1: Elektroforeogram SPLAT reakce



Žitná translokace jako marker zhoršené pekařské jakosti byl detekován metodou RAPD (Iqbal a Rayburn, 1995). Výsledný produkt má velikost 1,2 kb. Pro přítomnost žitné translokace pšenice je možné využít také SPLAT reakci poskytující produkt o velikosti 1,5 kb (obr. 2) (Francis et al., 1995) a

metoda SPLAT, kdy se v případě absence žitné translokace na elektroforeogramu objeví produkt o velikosti 636 bp (Van Campenhout et al., 1995). Přítomnost sekalinových produktů u analyzovaných genomů pšenice byla prokázána u odrůd Athlet, Livia, Mona, Rialto, Sida a Sparta.

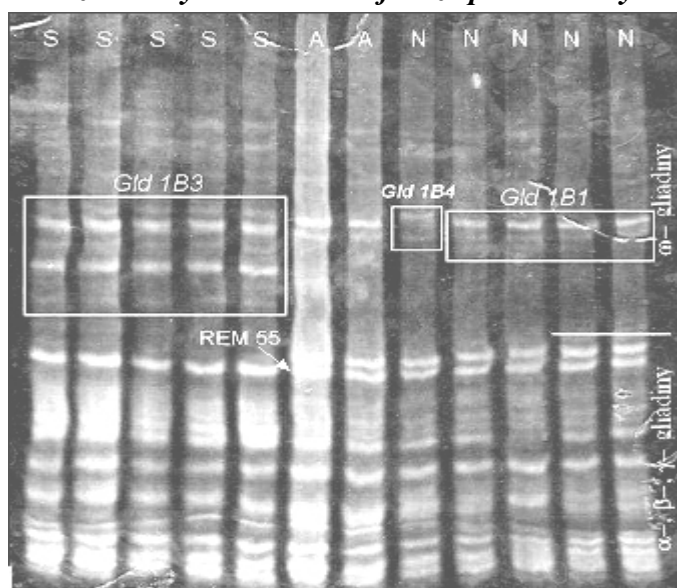
Obrázek 2: Elektroforeogram RAPD reakce



Markerováním technologické kvality zrna pšenice, odolnosti ke rzi travní a dalších znaků pomocí alelických gliadinových a gluteninových bloků se zabývala řada autorů (Kubánek et al., 1999, Černý a Šasek, 1996, Černý et al., 1990). Kubánek et al. (1999) zjistili, že je pro detekci pekařské jakosti dostačující stanovit podjednotky gluteninů s VHM a gliadinový blok na 1B. Rovněž Bednář et al. (1999b) potvrdili, že není možné použít pro predikci technologické jakosti jednotlivé systémy zásobních bílkovin samostatně, jako příkladu uvádějí odrůdu Danubia, která má nejvyšší možnou hodnotu Gluscore 10, ale přítomnost gliadinového bloku *Gld 1B3* detekuje žitnou translokaci 1BL.1RS a tím horší pekařskou kvalitu. Provedené analýzy polymorfismu prolaminových bílkovin (obr.3) verifikovaly výskyt žitné translokace 1BL.1RS pomocí gliadinového bloku *Gld 1B3* u odrůd Athlet, Livia, Mona, Rialto, Sida a Sparta. U ostatních analyzovaných odrůd byly v lokusu *Gld 1B* prokázány alely 1 a 4, popřípadě jejich kombinace.

Při porovnání metod detekce žitné translokace 1BL.1RS u pšenice pomocí polymorfismu prolaminových zásobních bílkovin obilky a metody RAPD bylo dosaženo shodných výsledků. Současně bylo použití metody detekce polymorfismu bílkovin časově méně náročné a levnější. Naopak metoda RAPD umožnila využití selekce v ranějších fázích ontogeneze pšenice. Analýzy pomocí polymorfismu DNA v porovnání s bílkovinnými markery mají také tu výhodu, že nevyžadují expresi genetické informace do primární struktury proteinu a tudíž je zde zcela eliminován vliv vnějšího prostředí.

Obrázek 3: Výsledná elektroforéza prolaminových zásobních bílkovin odrůd Astella a Niagara



Pozn: S – Sparta, A – Astella, N – Niagara

Závěr

Podle výskytu alely *Glu 1D 5+10* a žitné translokace 1BL.1RS lze analyzované odrůdy ozimé pšenice rozdělit do tří skupin podle predikce pekařské kvality:

Donory dobré pekařské jakosti – byla prokázána přítomnost alely *Glu 1D 5+10* a absence žitné translokace 1BL.1RS. Jsou to odrůdy Astella, Brea, Ebi, Niagara. U analyzovaných odrůd lze předpokládat vysokou pekařskou jakost.

Donory průměrné pekařské jakosti – u těchto genotypů jsou dva případy. Byla prokázána přítomnost alely *Glu 1D 5+10* i žitná translokace 1BL.1RS a v případě druhého alela *Glu 1D 5+10* ani žitná translokace 1BL.1RS prokázána nebyla. Byly sem zařazeny odrůdy Apache, Athlet, Estica, Livia, Mona, Sparta.

Donory horší pekařské jakosti – byla prokázána přítomnost žitné translokace 1BL.1RS a absence alely *Glu 1D 5+10*. Jako donory horší pekařské jakosti se projeví odrůdy Sida a Rialto.

Dosažené výsledky potvrzují, že metody biochemických a molekulárních markerů lze vhodně využít nejen ve šlechtění pro selekci na požadované znaky a vlastnosti, ale i např. v potravinářském průmyslu pro identifikaci odrůd, stanovení odrůdové pravosti a čistoty nebo při dovozu, vývozu, nákupu a prodeji osiva a sadby.

Literatura

Přehled citované literatury je k dispozici u autora.

Práce byla uskutečněna za finanční podpory FRVŠ MŠMT 195/2002, 1218/2003 a výzkumného záměru AF MZLU v Brně MSM 432100001.

Kontaktní adresa autora: Ing. Zuzana Kocourková, Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6 – Suchbát, E-mail: kocourkovaz@af.czu.cz

