

**DETEKCE ALEL PRO VYSOKOMOLEKULÁRNÍ PODJEDNOTKY GLUTENINŮ  
U TRITIKALE POMOCÍ DNA MARKERŮ**  
**DETECTION OF ALLELES FOR HIGH-MOLECULAR-WEIGHT GLUTENIN  
SUBUNITS IN TRITICALE USING DNA MARKERS**

Tomáš Vyhnánek<sup>1</sup>, Eva Halouzková<sup>1</sup>, Václav Trojan<sup>1</sup>, Petr Martinek<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

Molecular markers were used to identify the allele composition of loci *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* of high-molecular-weight (HMW) glutenin subunits in 15 triticale genotypes (varieties and breeding lines). Amplified DNA fragments of HMW glutenin alleles were separated by agarose slab-gel electrophoresis. Differences between all the three alleles at the locus *Glu-A1* [*Glu-A1a* (encoding Ax1), *1b* (Ax2\*) and *1c* (AxNull)] were observed. PCR reaction (annealing) of a specific marker was optimised for the allele *Glu-A1b* in PS3 primer combination. In the variety Palomino the alleles *Glu-A1b* and *Glu-A1c* were detected from different DNA isolations. DNA was isolated from a mixed sample and so it was not possible to distinguish whether it was an admixture in the seed sample or a heterozygous constitution of the genotype. Two alleles were detected at the locus *Glu-B1* [*Glu-B1-1a* (encoding Bx7) and *Glu-B1-1b* (Bx7\*)] by PS4 primer. The allele *Glu-D1d* (HMW subunits 5+10) was detected in breeding lines that carried translocations of segments of wheat chromosome 1D to rye chromosome 1R only. Identification of wheat *Glu-1* alleles using DNA markers can be an alternative for early selection of triticale genotypes with good bread-making quality.

**Keywords:** triticale, *Glu-1*, allelic variation, allele-specific markers, HMW glutenin subunits

---

**ÚVOD**

Od pšenice seté (*T. aestivum* L.,  $2n = 6x = 42$ , BBAADD) se hexaploidní tritikale (X *Triticosecale* Wittmack,  $2n = 6x = 42$ , BBAARR) liší přítomností žitného genomu R, kterým byl nahrazen genom D pšenice. Tritikale lze pokládat za významnou plodinu využitelnou pro zvyšování produkce především v marginálních oblastech, kde již nyní poskytuje lepší výnosy i rentabilitu pěstování oproti pšenici. V současnosti je využíváno především ke krmným a průmyslovým účelům, jeho využitelnost pro lidskou výživu je zatím zanedbatelná. Velkou výzvou, která stojí před genetiky a šlechtiteli, je vytvoření tritikale pro potravinářské využití. Znamenalo by to dosažení takových technologických parametrů, které by byly podobné jako u odrůd pšenice určených pro pečení chleba. Pekařské odrůdy tritikale by měly mít rovněž podobné spektrum vhodných gluteninových a gliadinových alel jako u potravinářské pšenice. U pšenice jsou gluteniny kódovány na dlouhém ramenu 1. homeologické skupiny chromosomů (1BL, 1AL a 1DL) a gliadiny na krátkých ramenech 1. a 6. homeologické skupiny (1BS, 1AS, 1DS, 6BS, 6AS a 6DS) (Gálová et al., 1998, McIntosh, et al., 2006). Vliv běžně se vyskytujících gluteninových a i gliadinových alel na pekařskou kvalitu je známý a lze ho vyjádřit pomocí „skóre“ - míry jakou ho ovlivňují v kladném nebo i záporném smyslu (Payne a Lawrence 1983, Metakovsky et al., 1997). U tritikale přítomnost sekalinů, kterými byly nahrazeny gluteniny a gliadiny na 1D a 6D vede k odlišné technologické kvalitě, která se jeví jako nevhodná pro pekárenství (Peña, 2004). K průlomu došlo u tritikale po vytvoření série translokací chromosomu 1R, do kterého byl přenesen z chromosomu 1D segment s alelou *Glu-D1d* (který nahradil *Sec-3*), případně ještě další segment nesoucí *Gli-D1* a *Glu-D3* a další segment nahrazující *Sec-1* (Lukaszewski, 1998, 2006).

Využití donorů těchto translokací umožnilo dosáhnout důležitých zlepšení pekařské kvality u tritikale (Woś et al., 2008, Matějková et al., 2009). Úspěšnost šlechtění tritikale pro pekařské účely závisí však nejen na využití výše zmíněných translokací,

ale rovněž na vhodné sestavě zásobních bílkovin kódovaných na chromosomech pšeničného původu a na zabudování genů pro nižší aktivitu hydrolytických enzymů.

Práce se zabývá dílčí problematikou orientovanou na detekci vybraných alel kódující vysokomolekulární (HMW) podjednotky gluteninů u současných odrůd a linií tritikale s tím, že do budoucna by rozpracování těchto detekčních metod mělo vést k cílenému výběru parentálních genotypů pro hybridizaci tak, aby bylo možné vytvářet linie tritikale s předem navrženými alelickými sestavami pro požadované gluteninové, respektive gliadinové a sekalinové typy zásobních bílkovin zrna.

Ve šlechtění tritikale na zlepšenou pekařskou kvalitu se stále více využívají vhodné genetické markery. Vhodnými metodami, které to umožňují, jsou např. polyakrylamidová elektroforéza zásobních proteinů obilky (SDS-PAGE a A-PAGE) (Payne a Lawrence, 1983), případně jejich chromatografická analýza (RP-HPLC) (Wieser et al., 1998) a kapilární elektroforéza (Bean a Lookhard, 2000). Rozvíjí se i aplikace DNA markerů pšenice a žita založená na PCR (Salmanowicz a Dylewicz, 2007).

Cílem práce byla identifikace alel lokusů *Glu-A1*, *Glu-B1* a *Glu-D1* pro gluteninové jednotky s vysokou molekulovou hmotností (HMW) u vybraných genotypů tritikale pomocí alelicky specifických DNA markerů.

## MATERIÁL A METODY

Identifikace alel lokusů *Glu-1* (*Glu-A1*, *Glu-B1* a *Glu-D1*) byla realizována u 15 genotypů tritikale (Tabulka 1). Směsné vzorky osiva byly získány z Agrotestu fyto, s.r.o. Kroměříž v roce 2008. Pro molekulární analýzy byla genomová DNA izolována pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit (f. Qiagen) z napěstovaných rostlin ve fázi jednoho listu (5-7 dní staré rostliny). Koncentrace DNA ve vzorku byla po izolaci zjištěna spektrofotometricky. Pro detekci jednotlivých alel lokusu *Glu-A1* byly použity primerové kombinace PS1 a PS2 (Lafiandra et al., 1997) a PS3 (De Bustos et al., 2000), v případě lokusu *Glu-B1* primerové kombinace PS4 (Butow et al., 2004). Pro detekci alely *Glu-D1d* byl využit protokol D'Ovidio a Anderson (1994).

**Tabulka 1** Analyzované genotypy tritikale

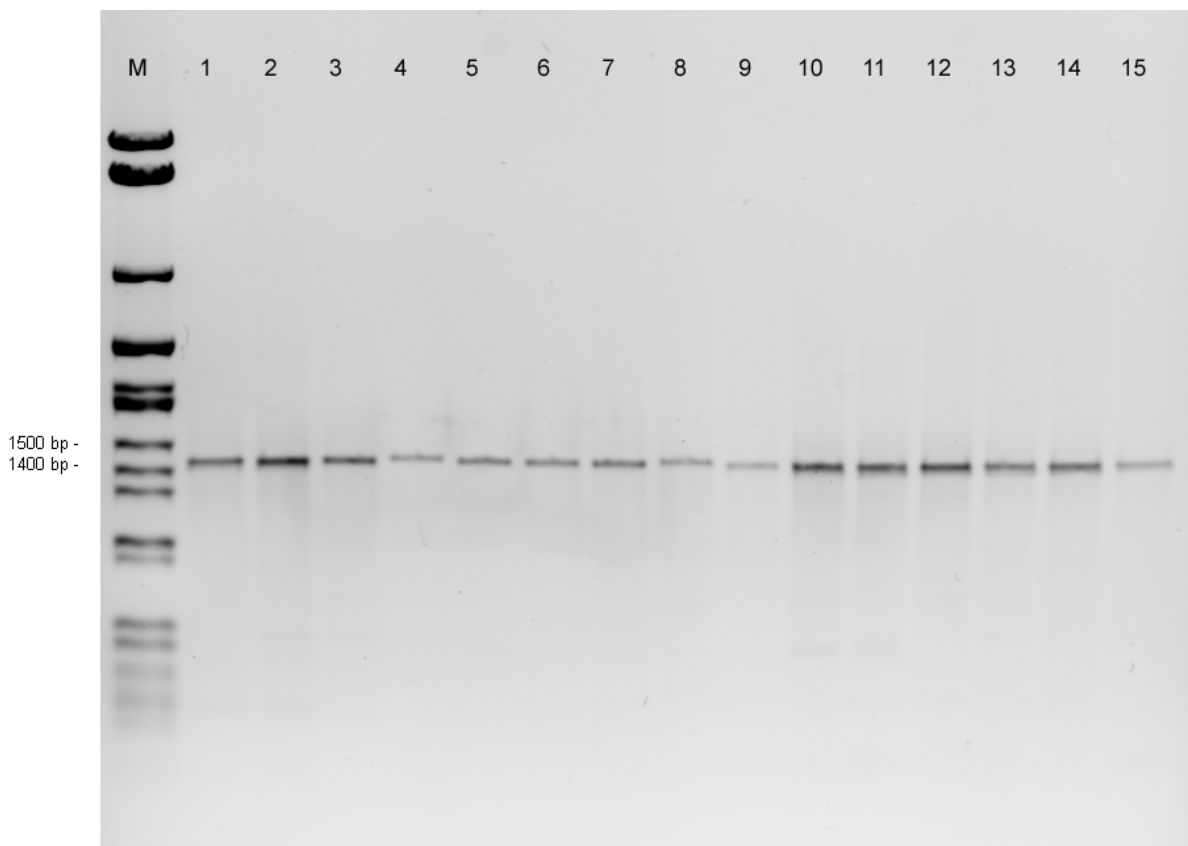
Genotyp		Firma
Agrano		Pflanzenzucht Saka, GbR (GER)
Baltiko, Benetto, Leotino, Madilo, Palomino		Danko Hodowla Roslin, Sp. z o. o. (PL)
Mungis		KWS Lochow GmbH (GER)
Nazaret		Selgen, a. s. (CZE)
Pawo		Hodowla Roslin Strzelce, Sp. z o. o. (PL)
SW Talentro		SW Seed BV (NDL)
V2-18-08, V2-36-08, V2-45-08	translokace 1R.1D <sub>5+10</sub> -2	Linie vytvořené v Kroměříži se zlepšenými pekařskými parametry. Obsahují různé typy translokací chromosomu 1R, které vytvořil A.J. Lukaszewski v USA.
V3-6-08, V3-41-08	translokace Valdy	

Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahuje: 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 Salmanowicz a Dylewicz (2007). Pro primerovou kombinaci PS3 byla optimalizována teplota annealingu (nasedání primerů) pro technické vybavení laboratoře pomocí gradientové PCR. Elektroforetická separace probíhala na 1,5 % agarosovém gelu (barvení ethidium bromidem) a výsledné DNA produkty byly srovnány s velikostními standardy (100 bp DNA

Ladder /Invitrogen/, pBR322 DNA *Hae*III /ABgene/ a  $\lambda$ DNA/*Eco*471(*Ava*II) /MBI Fermentas/) podle velikosti výsledného amplikonu.

### VÝSLEDKY A DISKUSE

Při použití primerové kombinace PS1 je možno rozlišit na základě výsledného produktu alelu *Glu-A1b* (1400 bp) od zbývajících dvou alel (1500 bp). V našem případě byl však rozdíl při použití teplotního a časového profilu **Salmanowicz a Dylewicz (2007)** mnohem menší než uváděných 100 bp (Obrázek 1). Pro lepší interpretaci a zkrácení doby analýzy je vhodné využít na základě našich zkušeností agarosový gel o nižší koncentraci, např. 0,5 - 1 %. Pro detekci výskytu alely *Glu-A1c* (produkt o velikosti 920 bp) byla úspěšně využita primerová kombinace PS2. Pro technické vybavení laboratoře Ústavu biologie rostlin AF nebylo nutné upravit teplotní a ani časový profil reakce. Pro ověření výsledků byla využita i primerová kombinace PS3 umožňující detekci alely *Glu-A1b* (produkt o velikosti 2650 bp). Při použití teplotního a časového profilu převzatého z literatury vznikalo větší množství nespecifických produktů, a tak byla na základě gradientové PCR zvýšena teplota annealingu z původních 57 °C na 58 °C při zachování původních časových období, což vedlo ke snížení počtu nespecifických amplikonů. Výsledky primerové kombinace PS3 korespondovaly s výsledky dosaženými při použití primerové kombinace PS1.



**Obrázek 1** Rozlišení alely *Glu-A1b* (produkt cca 1400 bp) od ostatních alel v lokusu

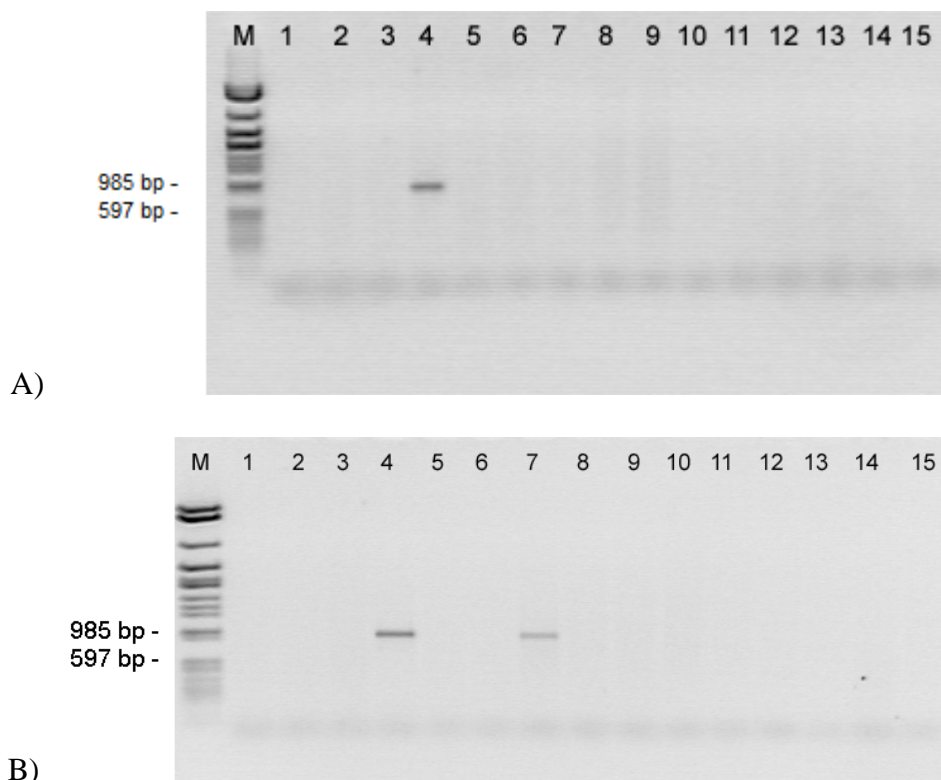
Vysvětlivky: M – velikostní marker  $\lambda$ DNA/*Eco*471(*Ava*II) /MBI Fermentas/, 1 - Agrano , 2 – Baltiko, 3 – Benetto, 4 - Leontino, 5 – Nazaret, 6 – Madilo, 7 - Palomino, 8 - Pawo, 9 – Mungis, 10 – SW Talentro, 11 – V2-36-08, 12 – V2-45-08, 13 – V3-6-08, 14 – V2-18-08, 15 – V3-41-08.

U většiny analyzovaných genotypů (86,7 %) byla detekována alela *Glu-A1b* (kódující Ax2\*). Výjimkou z analyzovaného souboru byla odrůda Leontino s alelou *Glu-A1c* (AxNull) a odrůda Pawo s alelou *Glu-A1a* (Ax1) (Tabulka 2). Stejných výsledků u odrůd Baltiko

a Pawo dosáhli **Salmanowicz a Dylewicz (2007)**. V případě odrůdy Palomino byly v různých izolacích detekovány dvě různé alely (Obrázek 2). Jednalo se o *Glu-A1b* a *Glu-A1c*. Využití směsných vzorků pro izolaci DNA neumožňuje konstatovat, zda se jedná o příměs cizího genotypu nebo o heterozygotní konstituci. Pro tyto účely by byla nutná analýza z jednotlivých rostlin. **Šašek et al. (2000)** uvádějí v případě jednotlivých alel lokusu *Glu-A1* predikční hodnoty pekařské jakosti pšenice, tzv. Glu skóre od 0 (*Glu-A1c*) do 1,5 (*Glu-A1b*).

V rámci lokusu *Glu-B1* jsme pomocí primerové kombinace PS4 získali specifické spektrum produktů v rozpětí od 180 do 920 bp umožňující rozlišení alel *Glu-B1-1a* (kódující Bx7) a *Glu-B1-1b* (Bx7\*). Alela *Glu-B1-1b* byla detekována jen u tří odrůd (Mungis, Palomino a Pawo). Ve zbývajících případech byla detekována alela *Glu-B1-1a* (80 %). Stejně jako u lokusu *Glu-A1* korespondují výsledky lokusu *Glu-B1* u odrůd Pawo a Baltiko s výsledky práce **Salmanowicz a Dylewicz (2007)**. Pro stanovení predikční hodnoty alel v lokusu *Glu-B1* je nutné stanovit, zda se mimo alel *Glu-B1-1a* a *Glu-B1-1b* nevyskytují i další alely ve vazebné skupině, např. primery publikovanými **Lei et al. (2006)**.

V případě alely *Glu-D1d*, která je u pšenice považována za marker dobré pekařské kvality, uvádějí **Šašek et al. (2000)** bodovou hodnotu 3. Tato alela byla v našem souboru detekována produktem o velikosti 450 bp jen u šlechtitelských linií vytvořených v Kroměříži (Obrázek 3), které obsahují některou z translokací chromosomu 1R. U standardních odrůd tritikale se chromosomy genomu D nevyskytují, tudíž ani nebylo možné tuto alelu detekovat.



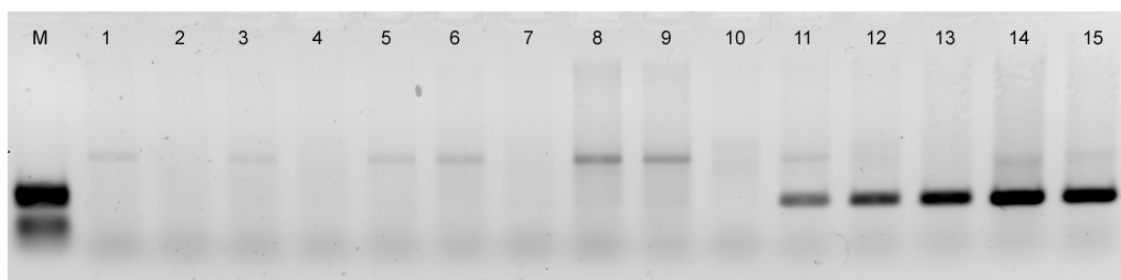
**Obrázek 2** Verifikace přítomnosti alely *Glu-A1c* (produkt 920 bp) ve dvou různých izolacích genomické DNA tritikale

Vysvětlivky: A) – první izolace, B) – druhá izolace, M – velikostní marker  $\lambda$ DNA/*Eco471*(*Ava*II) /MBI Fermentas/, 1 - Agrano, 2 – Baltiko, 3 – Benetto, 4 - Leontino, 5 – Nazaret, 6 – Madilo, 7 - Palomino, 8 - Pawo, 9 – Mungis, 10 – SW Talentro, 11 – V2-36-08, 12 – V2-45-08, 13 – V3-6-08, 14 – V2-18-08, 15 – V3-41-08.

**Tabulka 2** Detekované alely v lokusu *Glu-1*

Genotyp	Alely lokusu <i>Glu-1</i>		
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>
Agrano	<i>b</i>	<i>1a</i>	-
Baltiko	<i>b</i>	<i>1a</i>	-
Benetto	<i>b</i>	<i>1a</i>	-
Leontino	<i>c</i>	<i>1a</i>	-
Madilo	<i>b</i>	<i>1a</i>	-
Mungis	<i>b</i>	<i>1b</i>	-
Nazaret	<i>b</i>	<i>1a</i>	-
Palomino	<i>b/c</i>	<i>1b</i>	-
Pawo	<i>a</i>	<i>1b</i>	-
SW Talentro	<i>b</i>	<i>1a</i>	-
V2-18-08	<i>b</i>	<i>1a</i>	<i>d</i>
V2-36-08	<i>b</i>	<i>1a</i>	<i>d</i>
V2-45-08	<i>b</i>	<i>1a</i>	<i>d</i>
V3-6-08	<i>b</i>	<i>1a</i>	<i>d</i>
V3-41-08	<i>b</i>	<i>1a</i>	<i>d</i>

Vysvětlivky: *Glu-A1a* (kóduje Ax1), *Glu-A1b* (Ax2\*), *Glu-A1c* (AxNull), *Glu-B1-1a* (Bx7), *Glu-B1-1b* (Bx7\*) a *Glu-D1d* (Dx5+Dy10)



**Obrázek 3** Verifikace přítomnosti alely *Glu-D1d* (produkt 450 bp)

Vysvětlivky: M – velikostní marker pBR322 DNA *Hae*III /ABgene/, 1 – Agrano, 2 – Baltiko, 3 – Benetto, 4 – Leontino, 5 – Nazaret, 6 – Madilo, 7 – Palomino, 8 – Pawo, 9 – Mungis, 10 – SW Talentro, 11 – V2-36-08, 12 – V2-45-08, 13 – V3-6-08, 14 – V2-18-08, 15 – V3-41-08.

## ZÁVĚR

V práci jsou prezentovány výsledky identifikace alel lokusu *Glu-1* (*Glu-A1*, *Glu-B1* a *Glu-D1*) pro podjednotky gluteninů s HMW u 15 genotypů tritikale. Předmětem dalšího studia bude optimalizace DNA markerů pro identifikaci alel v rámci lokusu *Glu-B1* pro možnost zpřesnění odhadu Glu-skóre za účelem predikce pekařské kvality. Popsané metody a protokoly mohou být prakticky využívány v rámci šlechtitelského programu tritikale na výběr lepší pekařské jakosti pomocí markerů, tzv. markery asistovaná selekce.

## LITERATURA

- BEAN, S. R., LOOKHART, G. L. 2000. Ultrafast capillary electrophoretic analysis of cereal storage protein and its application to protein characterization and cultivar differentiation. In *J. Agric. Food Chem.*, roč. 48, 2000, č. 2, s. 344-353. ISSN 0021-8561.
- BUTOW, B. J., GALE, K. R., IKEA, J., JUHASZ, A., BEDO, Z., TAMAS, L., GIANIBELLI, M. C. 2004. Dissemination of the highly expressed Bx7 glutenin subunits (*Glu-B1a1* allele) in wheat as revealed by novel PCR markers and HPLC. In *Theor. Appl. Genet.*, roč. 109, 2004, č. 7, s. 1525-1535. ISSN 0040-5752.

- 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. In *Theor. Appl. Genet.*, roč. 100, 2000, č. 7, s. 1085-1094. ISSN 0040-5752.
- D'OIDIO, R., ANDERSON, O. D. 1994. PCR analysis to distinguish between alleles of member of a multigene family correlated with bread-making quality. In *Theor. Appl. Genet.*, roč. 88, 1994, č. 6-7, s. 759-763. ISSN 0040-5752.
- GÁLOVÁ, Z., SMOLKOVÁ, H., MICHALÍK, I., GREGOVÁ, E. 1998. Predikcia pekárskej kvality zrna pšenice podľa elektroforetického spektra HMW glutenínových subjednotiek. In *Rost. Výr.*, roč. 44, 1998, č. 3, s. 111-116. ISSN 0370-663X.
- 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. In *Theor. Appl. Genet.*, roč. 94, 1997, č. 2, s. 235-240. ISSN 0040-5752.
- LEI, Z. S., GALE, K. R., HE, Z. H., GIANIBELLI, C., LARROQUE, O., XIA, X. C., BUTOW, B. J., MA, W. 2006. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the *Glu-B1* locus in hexaploid wheat. In *J. Cereal Sci.*, roč. 43, 2006, č. 1, s. 94-101. ISSN 0733-5210.
- LUKASZEWSKI, A. J. 1998. Improvement of breadmaking quality of triticale through chromosome translocations. In *Proceedings 4<sup>th</sup> International Triticale Symposium*, Red Deer, Alberta, Canada, July 26-31, 1998, s. 102-110. ISBN 0-9585592-5-2.
- LUKASZEWSKI, A. J. 2006. Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve bread-making quality of hexaploid triticale. In *Crop Sci.* roč. 46, 2006, č. 5, s. 2183-2194. ISSN 0011-183X.
- MATĚJKOVÁ, P., KUČEROVÁ, J., ŠOTTNÍKOVÁ, V., VYHNÁNEK, T., MARTINEK, P. 2009.: Parametry nově vytvořených linií tritikale šlechtěných na zlepšenou pekařskou jakost. In *Acta Fytotech. et Zootech.*, roč. 12, 2009, mimoriadne číslo, s. 414-422. ISSN 1335-258X.
- MCINTOSH R.A., DEVOS K.M., DUBCOVSKY J., ROGERS W.J., MORRIS, C.F., APPELS R., ANDERSON O.A. 2006. *Catalogue of gene symbols for wheat* [online]. 2006, [cit. 2009-10-30]. Dostupné na internete:  
 <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene//supplement2006.pdf>
- METAKOVSKY, E.V., ANNICCHIARICO, P., BOGGINI, G., POGNA, N.E. 1997. Relationship between gliadin alleles and dough strength in Italian bread wheat cultivars. In *J. Cereal Sci.*, roč. 25, 1997, č. 3, s. 229-236. ISSN 0733-5210.
- PAYNE, P. I., LAWRENCE, G. J. 1983. Catalogue alleles for the complex loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Dlu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. In *Cereal Res. Commun.*, roč. 11, 1983, č. 1, s. 29-35. ISSN 0133-3720.
- PEÑA, R.J. 2004. Food uses of triticale. In *Triticale improvement and production. Mergoum, M., Gómez-Macpherson, H. (Eds)*, Rome, FAO, 2004, s. 37-85. ISBN 92-5-105182-8
- SALMANOWICZ, B. P., DYLEWICZ, M. 2007. Identification and characterization of high-molecular-weight glutenin genes in Polish triticale cultivars by PCR-based DNA markers. In *J. Appl. Genet.*, roč. 48, 2007, č. 4, s. 347-357. ISSN 0021-504X.
- ŠAŠEK, A., ČERNÝ, J., SÝKOROVÁ, S., BRADOVÁ, J. 2000. *Inovované katalogy bílkovinných genetických markerů pšenice seté a ječmene*. 1. vyd., Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000, 51 s. ISBN 80-7271-002-8.
- WIESER, H., ANTES, S., SEILMEIER, W. 1998. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. In *Cereal Chem.*, roč. 75, 1998, č. 5, s. 644-650. ISSN 0009-0352.
- WOŚ, H., BRZEZINSKI, W., ARSENIUK, E., ZIMNY, J., WOŚ, J. 2008. Triticale of improved bread-making quality. Modern Variety Breeding and Future Needs., In *Proceedings*

*18<sup>th</sup> EUCARPIA General Congress*, Spain: Editorial Universidad Politécnica de Valencia, 2008, s. 661. ISBN 978-84-8363-302-1.

**Poděkování**

Práce byla podpořena projektem Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky MSM2532885901 etapou E a projektem Ministerstva zemědělství České republiky QI91B095.

**Kontaktní adresa:**

Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D., Eva Halouzková, Ing. Václav Trojan, <sup>1</sup>Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, Tel.: +420 545 133 185, e-mail: [vyhnanek@mendelu.cz](mailto:vyhnanek@mendelu.cz)  
Ing. Petr Martinek, CSc., <sup>2</sup>Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Czech Republic, Tel.: +420 573 317 152, e-mail: [martinek.petr@vukrom.cz](mailto:martinek.petr@vukrom.cz)