BREEDING OF TRITICALE FOR BETTER BREAD-MAKING QUALITY USING DNA MARKERS

Trebichalský A.[1], Martinek P.[2], Balážová Ž.[1]

[1]Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitre, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia

[2]Agrotest fyto, s.r.o., Havlickova 2787, 767 01 Kromeriz, Czech Republic

E-mail: andrej.trebichalsky@afnet.uniag.sk

ABSTRACT

Triticale (X *Triticosecale* Witt.) is a man-made hybrid created by crossing wheat (*T. aestivum* L.) and rye (*Secale cereale*). Therefore, the genom of triticale includes wheat chromosomes (AABB) and rye chromosomes (RR). The most spread and grown triticales are hexaploids (2n=6x=42 AABBRR. In hexaploid triticale the rye genome replaces the D genome of bread wheat. This work is aimed at developing triticale lines usable in the production of leavened bakery products. Two breeding strategies are employed that are based on various methods of Marker Assisted Selection (MAS) for detection of HMW glutenin allele *Glu-D1d* subunits 5+10 in spikes progenies. The allele *Glu-D1d* originating from wheat chromosome 1D is transferred to triticale using some types of chromosome 1R: 1R.1D $_{5+10}^{-1}$, 1R.1D$_{5+10}^{-2}$, Valdy, Valdy LH, FC1 and FC2. Translocation donors of chromosome 1R for this purpose have been developed and provided by Prof. Adam Lukasezwski (University of California, Riverside USA). *Glu-D1d* allele greatly participates on bread-making quality in bread wheat because it achieves the highest Glu-score. The SPLAT-PCR have been used for analysis of HMW glutenin subunit *Glu-D1d*. Final product was detected using 50 bp lenght marker GeneRule. A total of 255 F_4-F_8 spike progenies derived from various crosses of a triticale cultivar x a translocation donor were tested. *Glu-D1d* allele was confirmed in 155 cases which represents 60.7%. Totally, in 78 progenies with translocation 1.R.1D$_{5+10}^{-2}$ was detected allele *Glu-D1d*. Translocation with *Glu-D1d* allele was detected in 41 progenies. In F_8 generation we have analysed 22 samples with translocation Presto Valdy, *Glu-D1d* allele was confirmed in 20 cases (90.9%). As far as the translocation Valdy LH, *Glu-D1d was detected* in 12 samples (60% of all Valdy LH sample). This translocation has connection with spike lenght. FC1 translocation was found in 18 samples.

The development of triticale with bread-making grain quality will enable to extend the area planted with food cereals in worse soils where bread cultivars of triticale retain better amino acid composition.

Key words: triticale (*x Triticosecale* Witt.), bread-making quality, *Glu-D1d*, translocation

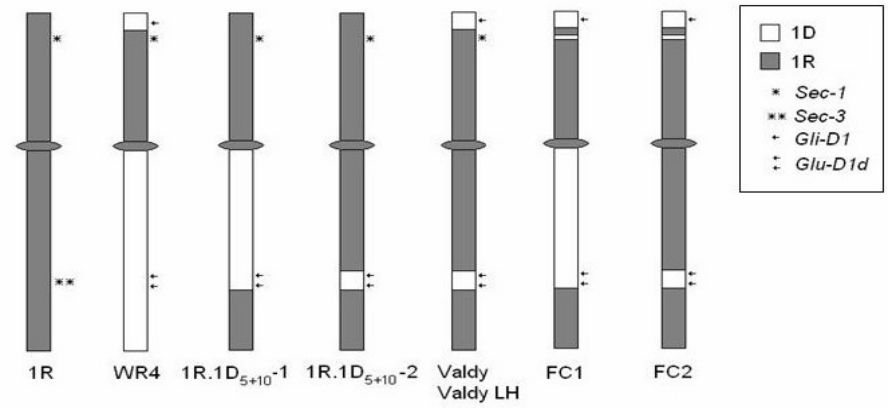
Acknowledgements: This project was supported by a VEGA project No. 1/0471/09.

ÚVOD

Význam alely *Glu-D1d* u pšenice je dostatočne známy a je možné v zásade konštatovať, že sa nachádza takmer vo všetkých odrodách pšenice s dobrou (A) alebo vynikajúcou (E) pekárskou kvalitou. Táto alela má tiež vysoké pozitívne tzv. glutenínové (pšeničné) skóre (asi 30 %), teda mieru, ktorou pozitívne prispieva k celkovej pekárskej kvalite. Vzhľadom k tomu, že *Glu-D1d* sa môže nachádzať na chromozóme 1D, ktorý v hexaploidnom tritikale (BBAARR) chýba, je možné do tritikale túto alelu preniesť napríklad pomocou príslušnej translokácie chromozómu 1R.1D. Problémom je, že chromozóm 1R rovnako nesie sekalínové lokusy, z ktorých hlavne *Sec1* výrazne negatívne ovplyvňuje pekársku kvalitu (odrody pšenice nesúce známu translokáciu 1BL.1RS, ktorá nesie na krátkom ramene *Sec1* naopak obvykle nie sú vhodné pre pekárske využitie z dôvodu, že *Sec1* má negatívne /ražné/ skóre). Vzhľadom k tomu, že vytvorenie pekárskych foriem tritikale by mohlo byť hospodársky veľmi významné (o čom nepochybujú v krajinách, kde je tritikale významne rozšírené) sa už niekoľko rokov cielene vyvíjajú translokácie chromozómu 1R.1D v tritikale, kde je cieľom nielen preniesť požadovaný segment nesúci *Glu-D1d* ale súčasne eliminovať účinky sekalínových lokusov *Sec3* a zvlášť *Sec1*. Profesor Adam J. Lukaszewski, 2007 (Univ. of California, Riverside, USA) vytvoril širokú škálu translokácií chromozómu 1R v tritikale (Obr. 1), ktoré sú postupne využívané v šľachtiteľských programoch v Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž (ďalej len KM) a v Hodowla Roslin Strzelce Sp. z o.o. - šľachtiteľská stanica Borowo v Poľsku (ďalej len BOH).

Vzhľadom k tomu, že na oboch pracoviskách sú značne odlišné podmienky v prípade finančného zabezpečenia šľachtiteľských programov tritikale, existujú na nich celkom odlišné stratégie selekcie.

Obr. 1 Vľavo je znázornený chromozóm 1R bez translokácie (je celý vyfarbený tmavo), vpravo od neho je séria odvodených translokácií s prenesenými segmentmi z chromozómu 1D, ktoré sú označené bielou farbou. Viacnásobné translokácie, ktoré nesú väčší počet segmentov prenesených z 1D sú nazvané Valdy, Valdy LH, FC1 a FC2. Niektoré pšeničné segmenty nahrádzajú sekalínové lokusy.



MATERIÁL A METÓDY

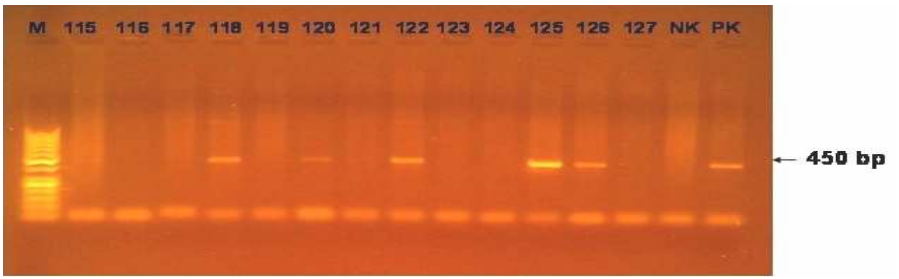
Na pracovisku v Kroměříži bolo v rokoch 2007/08 vysiate strojom Seedmatic celkom 2856 potomstiev klasov ozimného tritikale (každý klas do dvoch 80 cm dlhých riadkov) od 158 rozdielnych krížencov typu: odroda tritikale x donor translokácie v generáciách F_4 - F_8. Použité donory translokácie niesli niektorú z translokácií: 1R.1D$_{5+10}$-1, 1R.1D$_{5+10}$-2, Valdy, Valdy LH, FC1. U 10 cennejších krížencov, kde boli do kríženia použité krátkosteblé formy (s génom *Rht21*) a donory translokácie FC1 bol uskutočnený odber listov z jednotlivých dvojriadkov pre DNA analýzy. Listy boli odobrané z 500 potomstiev v dobe odnožovania a tieto boli uložené do hlbokomraziaceho boxu pri teplote -70 ^{0}C. Odber listov bol uskutočnený náhodne z rôznych rastlín v dvojriadkov, takže predstavujú zmesnú vzorku rastlín.

Počas vegetácie bola na poli uskutočnená selekcia perspektívnych potomstiev tak, že farebným sprejom boli označené najlepšie vyrovnané potomstvá s dobrou odolnosťou k hubovým chorobám, poliehaniu. Bolo označených a zozbieraných na poli 255 dvojriadkov (zhruba asi 10 %). Na molekulárne analýzy boli uskutočnené vo dvoch sériách, pričom boli použité vzorky z listov uchovaných v mraziacom boxe (1. séria vzoriek) a vzorky z listov mladých rastlín vypestovaných v rašelinových sadbovačoch (2. séria vzoriek).

Metodika DNA markerov pre detekciu *Glu-D1d* bola u tritikale rozpracovaná v Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně (Vinterová et al., 2003) a následne bola aplikovaná v laboratóriu molekulárnej genetiky v KM. Genómová DNA bola izolovaná pomocou DNAesy Plant Mini Kitu firmy Qiagen. Pre detekciu *Glu-D1d* bola použitá metodika PCR-SPLAT (D´Ovidio, Anderson, 1994) podľa modifikovaného PCR protokolu s využitím (5´) GCC TAG CAA CCT TCA CAA TC (3´), (5´) GAA ACC TGC TGC CGA CAA G (3´) primerov. Polymerázové reťazové reakcie (PCR) boli uskutočnené v objeme 20 µl zmesi v termocykleri následovne: denaturácia prebiehala pri 94°C 60 s, naviazanie primerov pri 55 ^{o}C 45 s a záverečná polymerizácia 30s pri 72 ^{o}C. Namnožená DNA po PCR reakcii bola detekovaná horizontálnou elektroforézou (Biometra - agagel standard) v 1,5 % agarózovom géli a fixovaná ethidium bromidom. Konečný produkt o veľkosti 450 bp, ktorý verifikuje prítomnosť alely *Glu-D1d* bol porovnaný a vyhodnotený na základe 50 bp dĺžkového markera GeneRuler od firmy Fermentas.

Rozdelenie analyzovaných vzoriek do dvoch sérií vzoriek umožnilo uskutočniť detekciu *Glu-D1d* pomocou DNA markerov v laboratóriu už od polovice júna a celý súbor sa podarilo zanalyzovať ešte do jesenného siatia roku.

Obr. 2 Elektroforetická separácia v 1,5 % agarózovom géli. M predstavuje 50 bp dĺžkový marker, 115-127 sú analyzované vzorky (u 118, 120, 122, 125 a 126 je pozitívny výsledok), NK a negatívna kontrola a PK je pozitívna kontrola. Fragment o veľkosti 450 bp je vyznačený šípkou. Ako negatívna vzorka sa použilo cv. Presto bez translokácie.



stratégia selekcie tritikale pre pekárske účely

V KM šľachtenie tritikale na pekársku kvalitu bolo zahájené v roku 2000, pokračovalo nadväzujúcim projektom GAČR: 521/03/0113 v rokoch 2003-2005. V KM bol kladený veľký dôraz na použitie homozygotných rodičovských donorových foriem nesúcich príslušné translokácie. Boli uskutočnené takmer výhradne jednoduché kríženia typu: významná odroda tritikale × donor translokácie. Takéto kríženie potom zaručuje, že v následných hybridných potomstvách možno očakávať 50% frekvenciu výskytu požadovanej translokácie. Pokiaľ nie sú finančné prostriedky na detekciu požadovanej alely *Glu-D1d* možno nechať hybridnú populáciu samoopelovať (selfovať) bez veľkého nebezpečenstva, že by sa frekvencia požadovanej alely znížila natoľko, že by nebola detekovateľná. Tento postup taktiež umožňuje presunúť uskutočnenie výberu klasov (alebo rastlín) do neskorších (vyšších) generácií, čo má výhodu, že je v nich vyšší podiel homozygotov, čo sa prejavuje navonok vyšším počtom vyrovnaných dvojriadkov.

V BOH sa uskutočňujú rovnako zložitejšie kríženia typu kedy F_1 (odroda × donor translokácie) je znovu krížená na odrodu. V týchto prípadoch je frekvencia požadovanej translokácie v F_2 populácii nižšia než 50 % a je nevyhnutné túto translokáciu ihneď detekovať. Pokiaľ by populácia bola ponechaná samoopeľovaniu, frekvencia translokácie by sa za niekoľko generácií postupne priblížila k nule a bola by veľmi ťažko zistiteľná. Typu kríženia je nevyhnutné prispôsobiť metódu selekcie. K detekcii translokácie používajú v BOH metódu elektroforetickej separácie bielkovín endospermu zrna SDS-PAGE, kde *Glu-D1d* je možné detekovať podľa bielkovín v pozícii 5 a 10 na elektroforetickom géli. SDS-PAGE možno s úspechom využiť v skorých generáciách, jej prednosťou je, že je lacnejšia. Je ju možné použiť taktiež pre rozlíšenie homozygotov a heterozygotov a pre detekciu sekalínových lokusov. Táto metóda umožňuje analyzovať i jednotlivé zrná, pričom z ponechanej časti obilky so zárodkom možno dopestovať rastlinu. Rastliny nesúce *Glu-D1d* v raných generáciách je možné následne ustáliť pomocou metód explantátových kultúr z nezrelých prašníkov a následnej tvorby dihaploidov.

Na rozdiel od SDS-PAGE metóda DNA-markerov pre detekciu *Glu-D1d* využíva spravidla listy ako východzí materiál pre izoláciu DNA, neumožňuje od seba rozlíšiť homozygotov a heterozygotov a je o niečo drahšia. Metoda využívajúca elektroforetickú separaciu bielkovín pracuje teda s translačnými produktmi hodnotených génov - proteínmi, zatiaľ čo metóda DNA markerov detekuje daný gén priamo.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo bola alela *Glu-D1d* dokázaná u 155 potomstiev čo predstavuje 60,7 % z celkového analyzovaného súboru (tabuľka 1.1). Z tohto počtu boli najpočetnejšie zastúpené vzorky nesúce jednoduchú translokáciu 1R.1D_{5+10}-2 až 78 potomstviev čo predstavuje 50,3 %. Pri tejto translokácii je bochník mierne sploštený a cesto málo lepivé. Pri hybride Presto I. R. (3) x SG-U 204 v F_8 generácii bola dokázaná prítomnosť alely *Glu-D1d* až v 30 potomstvách z celkového počtu 41 potomstiev, čo predstavuje 73,1 %. Druhou najpočetnejšou translokáciou bola dvojitá translokácia Valdy, ktorá sa vyskytovala v 41 vzorkách. Analyzovali sme 22 vzoriek Presto Valdy v F_8 generácii, pričom sme dokázali prítomnosť alely *Glu-D1d* alely až v 20 vzorkách (90,9 %). Táto translokácia podobne ako translokácia 1R.1D_{5+10}-2 nesie sekalínový lokus *Sec-1* na krátkom ramene chromozómu 1R. Vzorky s touto alelou pochádzali celkovo z 9 rôznych krížencov.

Translokáciu Valdy LH sme určili vo 12 vzorkách z celkového počtu 20 vzoriek v F_6 generácie čo predstavuje 60 % vzoriek. Táto translokácia má väzbu na dĺžku klasu na rozdiel od translokácie Valdy. Donorové genotypy predstavovali nasledovné krížence: Ticino/Valdy (1) Long Head, TcV1/02-33/Valdy (3) Long Head, SG-U 228/Valdy (3) Long Head, Valdy (1) Long Head/Trimaran, Valdy (2) Long Head/SG-U 250 a SG-U 249/Valdy (1) Long Head.

Tab. 1 Prehľad vybraných línií ozimného tritikale nesúcich alelu *Glu-D1d*

Translokácia	**Pôvod**	**Počet línií**	**Generácia 2009**
1R.1D$_{5+10}$-2	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 3)/Binova	2	F_9-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 4)/Trimaran	1	F_8-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 5)/Babor	3	F_8-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 3)/SG-U 204	30	F_9-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 1)/Babor	8	F_9-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 1)/Binova	3	F_9-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 1)/Moreno	14	F_9-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 1)/Saka 3005-92	1	F_9-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 1)/Trimaran	1	F_9-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 3)/SG-U 137	11	F_9-09
	Presto 1R.1D$_{5+10}$-2 (línia 3)/SG-U 204	4	F_9-09
Celkom línie s translokáciou 1R.1D$_{5+10}$-2		**78**	
Valdy	Presto Valdy 26-97 (línia 7)/Moreno	2	F_8-09
	Presto Valdy (línia 7)/Babor	12	F_8-09
	Presto Valdy (línia 7)/Saka 3005-92	2	F_8-09
	Presto Valdy (línia 8)/Binova	6	F_8-09
	SG-U 137/Presto Valdy 26-97 (línia 8)	1	F_7-09
	SG-U 204/Presto Valdy 26-97 (línia 10)	4	F_6-09
	SG-U 204/Presto Valdy 26-97 (línia 8)	2	F_6-09
	SG-U 228/Presto Valdy 26-97 (línia 7)	3	F_6-09
	Ticino/Presto Valdy 26-97 (línia 8)	2	F_6-09
	Presto Valdy 26-97 (línia 10)/SG-U 246	1	F_6-09
	Presto Valdy 26-97 (línia 8)/SG-U 250	3	F_6-09
	Presto Valdy 26-97 (línia 7)/SG-U 228	2	F_6-09
	SG-U 249/Presto Valdy 26-97 (línia 7)	1	F_6-09
Celkom línie s translokáciou Valdy		**41**	
Valdy LH	SG-U 228/Presto Valdy LH (línia 3)	2	F_7-09
	SG-U 249/Presto Valdy LH (línia 1)	3	F_7-09
	TcV1/02-33/Presto Valdy LH (línia 3)	2	F_7-09
	Ticino/Presto Valdy LH (línia 1)	4	F_7-09
	Presto Valdy LH (línia 1)/Tc V2-02-6	3	F_7-09
	Presto Valdy LH (línia 1)/Trimaran	1	F_7-09
	Presto Valdy LH (línia 2)/SG-U 250	3	F_7-09
Celkom línie s translokáciou Valdy LH		**18**	
Valdy alebo FC1	Presto Valdy (línia 1)//Presto FC1/Krakowiak	5	F_5-09
FC1	Presto FC1/IP21Y04T	2	F_5-09
	Presto FC1/Krakowiak	7	F_5-09
	Presto FC1/M420	5	F_5-09
	Presto Aq1-23/Presto Rht21//Presto FC1/Presto 6Rkr	4	F_5-09
Celkom línie s translokáciou FC1		**18**	
substitúcia 1D(1R) + MA1	Presto MA1 1D(1R) (BC3)	1	F_4-09
Celkový počet línií s výskytom *Glu-D1d*		**155**	

Pekárska kvalita je veľmi komplexný znak, ktorý je okrem viskoelastických charakteristík lepkovej bielkoviny podmienený i radou iných charakteristík. Napríklad je len málo preštudovaná úloha nízkomolekulárnych gluteníov. Problematickým znakom, ktorý u tritikale negatívne ovplyvňuje výslednú kvalitu je zvyčajne vysoká aktivita α-amylázy a s tým spojená nízka odolnosť k prerastaniu. Tá je riadená úplne odlišným genetickým systémom ako akým sú riadené zásobné bielkoviny. V súčasnosti tento systém je jen čiastočne preštudovaný. Vhodnou kombináciou donorov nesúcich požadovanú alelu *Glu-D1d* a donorov odolnosti k prerastaniu by malo dôjsť k podstatnému zlepšeniu pekárskej kvality u tritikale. Najväčšiu perspektívu možno očakávať od využitia nových translokácií FC1 a FC2, u ktorých prítomnosť *Glu-D1d*, *Gli-D1* a súčasne odstránenie *Sec1* by mali viesť ku podstatnému zlepšeniu pekárskej kvality u tritikale.

Je dôležité upozorniť, že oboma metódami detekcie (SDS-PAGE, DNA-markery) možno detekovať len prítomnosť požadovanej alely vo vzorke alebo rastline, podľa čoho predpokladáme prítomnosť respektíve neprítomnosť danej translokácie. Pretože translokácie chromozómu 1 R boli vytvorené už mnohé (Obr. 1), bude vhodné nájsť spôsoby detekcie, ktoré by umožnili v šľachtiteľskom materiálu rozlišovať jednotlivé typy translokácií navzájom od seba.

ZÁVER

Pomocou DNA markerov bolo celkovo analyzovaných 255 klasových potomstiev v generácii F_4 - F_8 rôznych krížencov odrôd tritikale s donormi translokácie chromozómu 1R, kde tento chromozóm nesie pšeničný segment z chromozómu 1D s HMW gluteninovou alelou *Glu-D1d*. Tá má u pšenice výrazne pozitívny vplyv na technologickú kvalitu zrna a mala by podobným spôsobom zlepšovať kvalitu zrna aj u tritikale. Alela *Glu-D1d* bola potvrdená u 155 potomstiev tritikale, ktoré budú ďalej vysiate. U týchto potomstiev je možné očakávať zvýšený počet parametrov zlepšenej technologickej kvality nevyhnutných pre výrobu kysnutého pečiva.

LITERATÚRA

D´Ovidio R, Anderson O. D.: PCR analysis to distinguish between alleles of member of a multigene family correlated with bread-making quality.In. Theor. Appl. Genet. 88, 1994: 759-763.

Lukaszewski A. J.: Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve bread-making quality of hexaploid triticale. In Crop Sci. 46, 2006: 2183-2194.

Martinek P, Vinterová M, Burešová I, Vyhnánek T.: Agronomic and quality characterisctics of triticale (X *Triticosecale* Wittmack.) with HMW glutenin subunits 5+10. J. In Cereal Sci., 47(1), 2008, 1: 68-78.

Vinterová M., Bednář J., Ježíšková I., Martinek P.: DNA markers for high molecular weight glutenin subunits 5+10 used in wheat and triticale breeding. In Czech J. Genet. Plant Breed., 39(3), 2003: 69-72.

POĎAKOVANIE

Výskum bol podporený výskumným zámerom Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy Českej republiky: MŠMT 2532885901 - etapou E, projektom KONTAKT Česko-slovenskej spolupráce MEB 080827 a projektom Vedeckej garantovej agentúry SR VEGA č. 1/3474/06. Autor príspevku Ing. A. Trebichalský ďakuje Ing. Tomášovi Vyhnánkovi, PhD. z MZLU Brno za cenné rady pri využití

metodiky DNA markerov a Ing. Petrovi Martinekovi za umožnenie vykonania odbornej stáže na pracovisku Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříži.

ADRESY AUTOROV:

Ing. Andrej Trebichalský, doktorand Katedra biochémie a biotechnológie, FBP SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: andrej.trebichalský@afnet.uniag.sk

Mgr. Želmíra Balážová, PhD., Katedra biochémie a biotechnológie FBP SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel.: +421 376414327, e-mail: Zelmira.Balazova@uniag.sk

Ing. Petr Martinek, CSc., Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Česká republika, tel.: +420 573317158, e-mail: martinek.petr@vukrom.cz