

„Badania nad efektywnością markerów funkcjonalnych w powiązaniu z analizą reologiczną w mikroskali dla oceny cech jakościowych pszenicy zwyczajnej”

***Zadanie badawcze finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi
na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2014 roku
(nr decyzji: HOR hn 801-8-14, poz. nr 1)***

Kierownik projektu: prof. dr hab. inż. Bolesław Salmanowicz

Wykonawcy: dr inż. Monika Langner, mgr inż. Sławomir Franaszek

Wstęp

Podstawowym zadaniem współczesnej hodowli pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) jest tworzenie nowych wysoko i stabilnie plonujących odmian z jednoczesnym ukierunkowaniem ich na odpowiednią jakość. Dla poprawy jakości pszenicy niezbędne jest głębsze poznanie struktury i funkcji genomu pszenicy przy jednoczesnym wykorzystaniu zasobów genowych roślin pokrewnych. W ramach zadania realizowanego w bieżącym roku opracowywanymi markerami funkcjonalnymi były warianty alleliczne genów loci *Glu-3* (*Glu-A3*, *Glu-B3* i *Glu-D3*) kodujące niskocząsteczkowe podjednostki gluteninowe (LMW-GS) oraz ω -sekaliny (w genotypach pszenicy z translokacjami 1BL.1RS i 1AL.1RS). Badania prowadzono w ramach czterech podtematów badawczych: 1/ Opracowanie metodyki rozdziału i identyfikacji LMW podjednostek gluteninowych (LMW-GS) w ziarniakach pszenicy techniką wysokosprawnej wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej (CZE) na podstawie 21 odmian wzorcowych zawierających wyróżnione w literaturze warianty alleliczne genów w loci *Glu-3*, 2/ Identyfikacja LMW-GS w 54 krajowych odmianach pszenicy zwyczajnej o wybranych wariantach allelicznych genów loci *Glu-1* kodujących wysokocząsteczkowe podjednostki gluteninowe przy pomocy CZE, 3/ Weryfikacja allelospecyficznych markerów molekularnych dla identyfikacji alleli loci *Glu-A3* i *Glu-B3* na bazie 21 odmian wzorcowych oraz przeprowadzenie identyfikacji genów kodujących LMW-GS u 54 krajowych odmian pszenicy oraz 4/ Wstępne oszacowanie wpływu kompozycji LMW-GS na wybrane cechy jakościowe pszenicy przy zastosowaniu analiz reologicznych przeprowadzonych w mikroskali.

Materiały i metody

Wstępne analizy biochemiczne przeprowadzono w obrębie 21 odmian wzorcowych pszenicy zawierających dotychczas opisane w literaturze geny loci *Glu-3* (*Glu-A3*, *Glu-B3* i *Glu-D3*) kodujących LMW podjednostki gluteninowe. Ziarno do badań pozyskano z Australia Winter Cereale Collection w Calala (Australia) oraz GEVES Surgeres w Beaucouze (Francja). Równolegle prowadzono analizy biochemiczne i reologiczne na ziarnie pochodzącym z 54 krajowych odmian pszenicy zawierających 5 wybranych wariantów allelicznych genów kodujących wysokocząsteczkowe podjednostki gluteninowe (HMW-GS) (N/6+8/5+10, N/6+8/2+12, 1/7+9/5+10, 2*/7+9/2+12, N/7+9/5+10) oraz częściowo translokację pszenno-żytnią 1BL.1RS.

Analizy przeprowadzono przy zastosowaniu metod elektroforetycznych tj. SDS-PAGE, A-PAGE i wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej (CZE) oraz allelospecyficznych i STS markerów molekularnych sprzężonych z cechami jakościowymi pszenicy. Podstawowe parametry fizykochemiczne ziarna i mąki uzyskanej w wyniku zmielenia na młynie Brabender Junior oznaczano techniką NIR na aparacie Diode Array 7200 spektrofotometer (Perten Instruments AB). Rozdziały metodą CZE przeprowadzano na kapilarach

krzemionkowych, stosując jako bufor rozdzielczy roztwory zawierające kwas iminodietowy (IDA), glikol polietylenowy (PEO) o M_r 8 000 000 and acetonitryl (AcN). Na podstawie uzyskanych czasów migracji dla poszczególnych pików białkowych wyznaczano skład jakościowy podjednostek białkowych frakcji LMW-GS. DNA izolowano z dwutygodniowych siewek pojedynczych ziarniaków wg metody Dorokhova. Obecność poszczególnych alleli LMW-GS występujących w badanych próbach zidentyfikowano za pomocą reakcji PCR przy użyciu 18 zestawów starterów.

Analizy reologiczne w mikroskali (10g mąki) przeprowadzono przy zastosowaniu miksografu oraz analizatora tekstury (firmy Stable SMS, W. Brytania). Wyznaczano osiem podstawowych parametrów miksograficznych w wyróżnionych trzech fazach pomiaru (adsorpcji wody, rozwoju i wyrobienia ciasta) oraz cztery parametry podczas deformacji ciasta metodą Kieffer'a (siłę ciasta, wydłużenie przy max. sile ciasta, elastyczność oraz pracę włożoną w odkształcenie ciasta – pole powierzchni pod krzywą).

Wyniki

W wyniku przeprowadzonej optymalizacji warunków rozdziału metodą CZE, uzyskano wysoką rozdzielczość pików białkowych wyizolowanej frakcji LMW-GS, dobrą powtarzalność rozdzielczy podczas kolejnych analiz oraz krótkie czasy migracji poszczególnych podjednostek gluteninowych. Najlepszą rozdzielczość uzyskiwano stosując jako bufor rozdzielczy 75 mM roztwór IDA o pH 2,74 zawierający 0,3% PEO oraz 20% AcN. Optymalne rozdziały uzyskiwano przy napięciu 10,5 kV w temperaturze 40 °C, stosując kapilary krzemionkowe o średnicy wewnętrznej 50 µm i długości całkowitej 31 cm. Na CZE profilach obserwowano obecność 3-4 izoform białkowych kodowanych przez allele locus *Glu-B3* oraz 1-2 izoform przez allele loci *Glu-A3* i *Glu-D3*. Czasy migracji poszczególnych pików białkowych mieściły się w zakresie czasowym 9,1 -14,9 minut. Na podstawie oznaczonych czasów migracji pików białkowych dla poszczególnych izoform wydzielonych z frakcji LMW-GS odmian wzorcowych o znanych wariantach allelicznych kodujących poszczególne podjednostki zidentyfikowano skład jakościowy LMW-GS w badanych 54 krajowych odmianach pszenicy. W badanych odmianach krajowych stwierdzono występowanie 11 wariantów allelicznych genów loci *Glu-3*. Najczęściej reprezentowane były warianty alleliczne: *Glu-A3e/Glu-B3b/Glu-D3c*, *Glu-A3f/Glu-B3e/Glu-D3c* oraz *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3e*, występujące odpowiednio u 12, 8 i 6 odmian pszenicy. Wyróżniono 3 allele w loci *Glu-3A* i *Glu-3D* oraz 6 alleli kodujących LMW-GS w genomie *B*. Na podstawie pól powierzchni pików białkowych dokonano oceny udziałów ilościowych poszczególnych izoform białkowych LMW-GS w ziarniakach analizowanych prób.

Dla potwierdzenia poprawności identyfikacji LMW-GS w badanych próbach dokonanych przy pomocy CZE dodatkowo przeprowadzono weryfikacje oznaczeń przy pomocy allelospecyficznych markerów molekularnych. W badaniach techniką PCR wykorzystano 18 zestawów starterów opracowanych na podstawie znajomości sekwencji DNA kodujących i/lub promotorowych regionów badanych genów. Zastosowane markery potwierdziły obecność wyróżnionych wariantów allelicznych genów locus *Glu-3* w wzorcowych odmianach pszenicy, z wyjątkiem detekcji alleli *Glu-A3g* i *Glu-B3c*. Uzyskano pełną zgodność w identyfikacji poszczególnych alleli we wszystkich krajowych odmianach przy pomocy metody CZE i markerów molekularnych. Zastosowanie mikrosatelitarnych markerów molekularnych SCM9-Fi oraz PAWS5/S6 umożliwiło identyfikację pszenno-żytniej translokacji 1BL.1RS u 5 badanych odmian pszenicy (odmiany Brilliant, Forkida, Gecko, Meteor i Satyna).

Dla mąki pozyskanej z 54 odmian pszenicy przeprowadzono analizy reologiczne w mikroskali przy zastosowaniu miksografu i teksturometru. Najkorzystniejsze podstawowe parametry miksograficzne (najdłuższy czas rozwoju ciasta, szerokość krzywej w 10 min pomiaru) skorelowane dodatnio z wartością wypiekową mąki wykazywały odmiany posiadające HMW-GS podjednostki Ax1/Bx7+By9/Dx5+Dy10, a najsłabsze odmiany posiadające podjednostki AxNull/Bx6+By8/Dx2+Dy12. Przy czym, w obrębie poszczególnych podgrup pszenic o wyróżnionych składach jakościowych HMW-GS stwierdzano znaczną zmienność parametrów reologicznych, wskazującą na wpływ składu LMW-GS na cechy jakościowe pszenicy. Po uwzględnieniu zróżnicowania w składzie LMW-GS w badanym materiale wykazano, że najwyższy miksograficzny indeks jakości wykazywały odmiany posiadające warianty alleliczne *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c*, *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3a* oraz *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c*, natomiast najniższym średnim indeksem charakteryzowały się odmiany, w których występował wariant *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3e*. Odmiany pszenicy zawierające wariant alleliczny *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c* wyróżniały się najlepszymi parametrami miksograficznymi, natomiast odmiany zawierające wariant *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3e* posiadały szereg niekorzystnych parametrów reologicznych wskazujących na niską wartość wypiekową.

Podobnie jak w przypadku danych uzyskanych przy zastosowaniu miksografu, średnie wartości parametrów reologicznych (siła ciasta, wydłużenie w momencie zerwania ciasta, elastyczność ciasta oraz pracę wykonaną do momentu zerwania ciasta) oznaczone na teksturometrze metodą Kieffer'a wykazywały znaczne zróżnicowanie w obrębie 5 wyróżnionych podgrup o określonych składach HMW-GS. Po uwzględnieniu składu LMW-GS wykazano, że najkorzystniejsze parametry reologiczne świadczące o dobrych cechach jakościowych posiadają odmiany zawierające warianty alleliczne *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c* i *Glu-A3f/Glu-B3e/Glu-D3c*. Najmniej korzystne cechy reologiczne oznaczone metodą Kieffer'a wykazywały natomiast odmiany zawierające warianty *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3e* i *Glu-A3e/Glu-B3a/Glu-D3e*. Potwierdzono obniżenie wartości parametrów reologicznych oznaczonych zastosowanymi metodami u odmian zawierających pszenno-żytnią translokację 1BL.1RS.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że wolnostrefowa elektroforeza kapilarna jest użyteczną metodą szybkiej identyfikacji składu jakościowo-ilościowego LMW-GS w ziarniakach pszenicy zwyczajnej. Zastosowane zestawy allelospecyficznych markerów molekularnych potwierdziły występowania poszczególnych wariantów allelicznych genów loci *Glu-A3* i *Glu-B3* w badanym materiale roślinnym. Przeprowadzone analizy reologiczne w mikroskali wskazały, że skład jakościowo-ilościowy zarówno HMW-GS jak i LMW-GS na istotny wpływ na cechy jakościowe pszenicy. Stwierdzono szczególnie pozytywny wpływ trzech wariantów allelicznych *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c*, *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3a* oraz *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c* na cechy reologiczne mąki pszennej.