

EDWARD WITKOWSKI¹**JACEK WAGA**²**AMELIA BIELAWSKA**³**KRYSTYNA WITKOWSKA**¹**HELENA LUBER**⁴¹ Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o.² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład w Krakowie³ Emerytowany hodowca HRR „Nasiona Kobierzyc”⁴ HRR „Nasiona Kobierzyc”

Dziedziczenie białek gluteninowych warunkowanych locus na chromosomie 1A u mieszańców F₂ pszenicy ozimej*

Inheritance of glutenin proteins coded by the locus on chromosome 1A in F₂ hybrid genotypes of winter wheat

Badano dziedziczenie podjednostek glutenin wielkocząsteczkowych kodowanych chromosomem 1A u mieszańców F₂ uzyskanych z kombinacji krzyżowań, w których formy mateczne (odmiany Begra oraz Euris) zawierały niekodujący wariant białkowy typu *Glu A1*-null, natomiast formy ojcowskie zawierały podjednostki *Glu A1*-1 (odmiany Mikon i Astron) oraz *Glu A1*-2 (odmiana Tortija i ród MIB 496). Celem pracy było stwierdzenie czy geny warunkujące białka gluteninowe rozszczepiają się zgodnie z teoretycznie założonym stosunkiem rozszczepień 3:1 (warianty kodujące: niekodujących). Na podstawie wyników testu χ^2 stwierdzono, iż w niektórych kombinacjach liczebność klas genotypowych jest zgodna, natomiast w innych wykazuje odchylenia od mendlowskiego stosunku rozszczepień. W przypadku, gdy komponentem ojcowskim była odmiana Tortija wariant *Glu A1*-2 został niemal całkowicie wyparty przez formy typu null, natomiast w kombinacjach z odmianą Mikon wyeliminowany został wariant niekodujący.

Słowa kluczowe: pszenica ozima, gluteniny wielkocząsteczkowe, analiza elektroforetyczna, dziedziczenie mendlowskie

Inheritance of HMW glutenin subunits coded by the chromosome 1A was investigated in F₂ progenies obtained from eight cross combinations. Two parental components — winter wheat cultivars Begra and Euris — which contain “silent” gene for *Glu A1* locus were crossed with four winter wheat forms with subunits *Glu A1*-1 (cultivars Mikon and Astron) or *Glu A1*-2 (cultivar Tortija and line MIB

* Praca wykonana w ramach projektu badawczego własnego Nr 3 p06A 022 25 pt: “Zmienność podjednostek białek gluteninowych pod wpływem selekcji na wybrane cechy użytkowe w populacjach mieszańcowych pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L)” finansowanego przez Komitet Badań Naukowych PAN

496). We have tested whether three alleles of glutenin gene on the chromosome 1A segregated according to the theoretically assumed ratio 3:1 for presence: absence of *Glu A1* subunits using the χ^2 test. The observed segregation ratio agreed with the Mendelian 3:1 ratio in some crosses but significantly differed in another ones. In two extreme cases of progeny coming from combinations with cultivar Tortija gene coding for *Glu A1-2* subunit was almost completely eliminated whereas in combinations with variety Mikon the variant with "silent" gene was not observed.

Key words: winter wheat, HMW glutenin subunits, electrophoretic analysis, Mendelian inheritance

WSTĘP

Syntezę gliadyn i glutenin wielkocząsteczkowych warunkują geny skupione w obrębie dziewięciu loci na chromosomach 1.- i 6. grupy homeologicznej (Payne i in., 1984). Każdy locus tworzy serię alleli wielokrotnych obejmujących od kilku do kilkunastu wariantów. Produktami ekspresji alleli są polipeptydy bądź grupy polipeptydów określane jako bloki białkowe. Badania genetyczne z wykorzystaniem metod rozdziału elektroforetycznego wykazały, że obraz białek gliadynowych składa się z sześciu, natomiast glutenin z trzech bloków białkowych. W niektórych formach pszenicy można jednak stwierdzić brak ekspresji genów w obrębie jednego, rzadziej dwóch loci (Gianibelli i in., 2001). Ich obraz elektroforetyczny wykazuje charakterystyczny brak prążków wchodzących w skład określonego bloku białkowego. Przyczyną tego są prawdopodobnie uszkodzenia na poziomie DNA blokujące ekspresję genów w obrębie locus, bądź częściowa lub całkowita delecja regionów strukturalnych (Lafiandra i in., 1991). W efekcie powstają niekodujące warianty określane też jako „null” allele. Naturalne czynniki, sprzyjające powstawaniu takich uszkodzeń, nie zostały do końca poznane. Mogą to być np. podwyższone dawki promieniowania UV, długotrwała ekspozycja na niskie temperatury oraz inne stresy abiotyczne (Lafiandra i in., 1987). Szczególnie podatne na ich działanie są uprawy zlokalizowane w rejonach wysokogórskich (powyżej 2500 m n.p.m.). Potwierdzają to wyniki analiz elektroforetycznych i chromatograficznych białek zapasowych form pszenicy pochodzących z populacji lokalnych rosnących w górach Tybetu, u których stwierdzono większą częstotliwość null alleli niż u odmian i rodów pochodzących z innych regionów geograficznych (Bietz i in., 1975; Payne i in., 1984). W badaniach własnych obserwowano spontaniczne powstawanie null alleli u mieszańców orkiszu i pszenicy zwyczajnej (wyniki niepublikowane).

Warianty niekodujące gliadyn i glutenin są rzadko obserwowane wśród odmian i rodów pszenicy zwyczajnej uprawianych w Europie. Wyjątek stanowią gluteniny wielkocząsteczkowe warunkowane genem na chromosomie 1A. Tworzy on trzy alleliczne warianty. Dwa z nich odpowiadają za syntezę podjednostek oznaczonych symbolami *Glu A1-1* i *Glu A1-2*, natomiast trzeci typ allelela jest odpowiedzialny za wariant *Glu A1-null* (Payne i Lawrence, 1983). Analiza polimorfizmu białek gluteninowych w polskich kolekcjach roboczych i materiałach hodowlanych wykazała znaczną, liczebną przewagę wariantu null nad wariantami kodującymi (Węgrzyn i Waga, 1999). Dotychczas nie stwierdzono, co może być przyczyną tego zjawiska, czy jest ono efektem presji selekcyjnej ze strony hodowli czy też jego mechanizm ma podłoże genetyczne. Rozwiązanie tego problemu wydaje się ważne z praktycznego punktu widzenia, gdyż zaobserwowano

związek *Glu A1*-null z pogorszeniem cech jakościowych pszenicy (Węgrzyn i Waga, 1999; Rogers i in., 2001).

Celem pracy było stwierdzenie, czy w kombinacjach krzyżowań różnych form pszenicy ozimej zawierających warianty kodujące w locus *Glu A1* z formami zawierającymi wariant typu null, dziedziczenie podjednostek glutenin wielkocząsteczkowych przebiega zgodnie z mendlowskim stosunkiem rozszczepień, czy też będzie od niego odbiegać.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

W roku 2001 wykonano osiem kombinacji krzyżowań w dwóch seriach. Komponentami matecznymi były dwie odmiany pszenicy ozimej: Begra i Euris. Każdą z nich krzyżowano z czterema formami pszenicy ozimej: odmianami Mikon, Astron, Tortija oraz rodem MIB 496. W roku 2002 zebrano ziarniaki pokolenia F_2 , które przeznaczono do analizy elektroforetycznej.

Analizy elektroforetyczne

Podjednostki glutenin wielkocząsteczkowych oznaczono dla pojedynczych ziarniaków metodą elektroforezy na żelu poliakryloamidowym, w środowisku zasadowym z dodatkiem soli sodowej siarczanu dodecylu (SDS PAGE) według standardowej metody Laemmli optymalizowanej do warunków laboratoryjnych Zakładu Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż IHAR w Krakowie (Laemmli, 1970; Waga, 1997). Białka ekstrahowano roztworem 6M mocznika z dodatkiem 1,5% 2-merkaptetanolu. Rozdziały prowadzono w komorach elektroforetycznych Desaphor firmy Desaga na żelu rozdzielającym o całkowitym stężeniu akryloamidu $T = 10,12\%$ i stężeniu monomerów $C = 0,12\%$ przez około 4 godziny. Zastosowano dwa bufory elektrodowe – anodowy tris-HCl o $pH = 8,1$ oraz katodowy tris-glicyna o $pH = 8,9$. Żele barwiono w roztworze komasyny R250 o stężeniu 0,02% oraz G250 o stężeniu 0,006%. Dla ośmiu kombinacji krzyżowań przeanalizowano około 1300 ziarniaków. Skład podjednostek glutenin wielkocząsteczkowych oznaczono na podstawie katalogu Payne’a (Payne i in., 1983).

Analiza genetyczna

W badanym materiale wyodrębniono grupy genotypów różniących się między sobą podjednostkami glutenin kodowanymi chromosomem 1A. Każdą kombinację podzielono na dwie grupy mieszańców:

- Zawierających wariant kodujący (*Glu A1*-1 lub 2) — pierwszy typ homozygoty oraz heterozygoty
- Zawierających wariant niekodujący (*Glu A1*-null) — drugi typ homozygoty

Określono liczebność osobników w poszczególnych grupach genotypów. Zgodność liczebności obserwowanych z teoretycznie oczekiwanymi przy założonym stosunku rozszczepień 3:1 (wynikającym z połączenia grupy homozygot typu pierwszego i heterozygot) oszacowano na podstawie testu χ^2 .

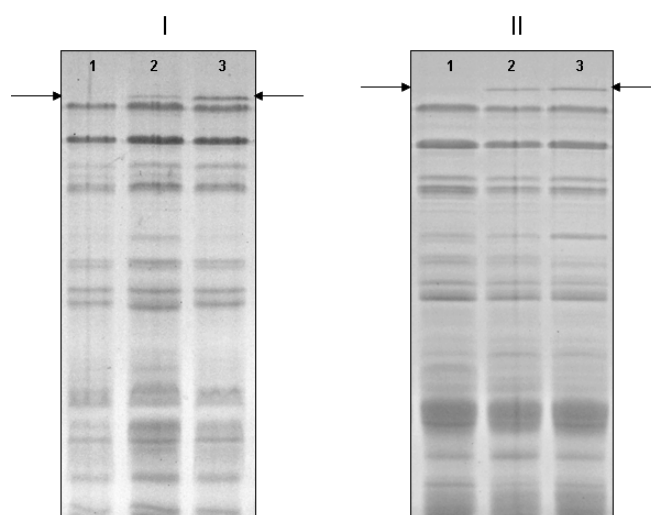
WYNIKI

Na podstawie analizy elektroforetycznej pojedynczych ziarniaków określono skład podjednostek białek gluteninowych form użytych jako komponenty rodzicielskie (tab. 1). Odmiany mateczne (Begra oraz Euris) zawierały wariant niekodujący typu *Glu A1*-null, formy ojcowskie Astron oraz Mikon zawierały podjednostkę *Glu A1*-1, natomiast ród MIB 496 oraz Tortija — *Glu A1*-2.

Tabela 1

Formuły elektroforetyczne białek gluteninowych komponentów rodzicielskich
Electrophoretic formulas of HMW glutenin subunits for the parental components

Odmiana Cultivar	Locus		
	Glu A1	Glu B1	Glu D1
Begra	Null	7+9	5+10
Euris	Null	7+9	5+10
Astron	1	7+9	5+10
Mikon	1	7+9	5+10
MIB 496	2	7+9	5+10
Tortija	2	7	5+10



I: 1 — *Glu A1*-null, 2 — *Glu A1*-2+null, 3 — *Glu A1*-2 (mieszanie z kombinacji Begra × MIB 496)

II: 1 — *Glu A1*-null, 2 — *Glu A1*-1+null, 3 — *Glu A1*-1 (mieszanie z kombinacji Begra × Mikon)

Rys. 1. Obraz elektroforetyczny mieszańców F₂ zawierających wariant kodujący, niekodujący oraz typ heterozygoty genu białek gluteninowych na chromosomie 1A. Strzałkami zaznaczono miejsce ekspresji allele *Glu A1*

I: 1 — *Glu A1*-null, 2 — *Glu A1*-2+null, 3 — *Glu A1*-2 (hybrids coming from the combination Begra × MIB 496)

II: 1 — *Glu A1*-null, 2 — *Glu A1*-1+null, 3 — *Glu A1*-1 (hybrids coming from the combination Begra × Mikon)

Fig. 1. Electrophoregrams of HMW glutenin subunits in the F₂ hybrid genotypes. Null variant, subunits of 1 and 2 type as well as heterozygotes coded by genes on the chromosome 1A are visualized. Bands coded by the *Glu A1* locus are marked by the arrows

Na obrazie elektroforetycznym glutenin wielkocząsteczkowych mieszańców pokolenia F₂ zaznaczono strefę, w której zlokalizowane są podjednostki warunkowane przez locus *Glu A1* tj. *Glu A1-1* i *Glu A1-2* oraz wariant *Glu A1-null* (rys. 1).

Wyniki testu χ^2 dla kombinacji wykonanych z odmianą Begra wykazały zgodność obserwowanego stosunku rozszczepień z teoretycznie oczekiwanym w przypadku, gdy komponentami ojcowskimi była odmiana Astron oraz ród MIB 496 (tab. 2). W kombinacji Begra × Mikon obserwowano znaczne odstępstwo od teoretycznie założonego stosunku, a wynik testu χ^2 odbiegał od wartości tabelarycznych. Gdy komponentem ojcowskim była Tortija obserwowano efekt odwrócenia liczebności w rozpatrywanych klasach genotypowych, co przejawiało się niemal całkowitą eliminacją wariantów kodujących.

Tabela 2

Test χ^2 dla podjednostek *Glu A1* w potomstwie F₂ czterech kombinacji krzyżowań z odmianą Begra
Test χ^2 for *Glu A1* subunits in F₂ generation of four cross combinations with the cultivar Begra

Kombinacja Combination	HMW GS	SR	LE	LO	χ^2	P
Begra × Mikon	1+(1+null) null	3 1	78 26	92 12	10,05	0,01–0,001
Begra × Tortija	1+(1+null) null	3 1	118,5 39,5	3 155	150,31	brak lacking
Begra × Astron	1+(1+null) null	3 1	94,5 31,5	103 23	2,37	0,2–0,1
Begra × MIB 496	2+(2+null) null	3 1	148,5 49,5	156 42	1,52	0,3–0,2

Objaśnienia skrótów w nagłówkach tabeli; Abbreviations in heads

Kombinacja; Cross combination

HMW GS — Podjednostki glutenin wielkocząsteczkowych (locus *Glu A1*) — klasy genotypowe

HMW GS — High molecular weight glutenin subunits (*Glu A1* locus) — genotypical classes

SR — Stosunek rozszczepień/ Segregation ratio

LE — Liczebność oczekiwana/ Expected numbers

LO — Liczebność obserwowana/ Observed numbers

Tabela 3

Test χ^2 dla podjednostek *Glu A1* w potomstwie F₂ czterech kombinacji krzyżowań z odmianą Euris
Test χ^2 for *Glu A1* subunits in F₂ generation of four cross combinations with the cultivar Euris

Kombinacja Combination	HMW GS	SR	LE	LO	χ^2	P
Euris × Mikon	1+(1+null) null	3 1	74,25 24,75	99 0	33	brak lacking
Euris × Tortija	1+(1+null) null	3 1	132,75 44,25	3 142	357,93	brak lacking
Euris × Astron	1+(1+null) null	3 1	116,25 38,75	104 51	5,16	0,05–0,02
Euris × MIB 496	2+(2+null) null	3 1	199,5 66,5	196 70	0,24	0,7–0,5

Objaśnienia skrótów tak jak w tabeli 2; Abbreviations in heads as in the table 2.

W drugiej serii krzyżowań z odmianą Euris podobne zależności obserwowano w dwóch przypadkach. W kombinacji z rodem MIB 496 stwierdzono zgodność liczebności zaobserwowanych z teoretycznie oczekiwanym stosunkiem rozszczepień, jednak przy wyższej wartości p (0,7–0,5) niż w pierwszej serii krzyżowań (tab. 3). Podobny rozkład częstotliwości genotypów prowadzący do niemal całkowitej eliminacji wariantów kodujących obserwowano w przypadku odmiany Tortija. Natomiast w kombinacjach z odmianami Mikon i Astron wystąpiły znaczne odstępstwa od oczekiwanych stosunków rozszczepień, których efektem (w pierwszym przypadku) była całkowita eliminacja wariantów niekodujących.

DYSKUSJA

W niniejszej pracy przedstawiono opis badań nad dziedziczeniem glutenin wielkocząsteczkowych kodowanych chromosomem *1A* w kombinacjach, w których jedna z form rodzicielskich zawierała niekodujący wariant białkowy typu *Glu A1-null*. Geny warunkujące białka gluteninowe dziedziczą się w sposób kodominacyjny. Oznacza to, że obraz elektroforetyczny mieszańców F_1 uzyskanych z odmian $A \times B$ stanowi sumę prążków charakterystycznych dla obu komponentów rodzicielskich. W pokoleniu F_2 można obserwować trzy grupy osobników, zawierających prążki formy matecznej (homozygota typu A), sumę prążków form matecznej i ojcowskiej (heterozygota) oraz prążki formy ojcowskiej (homozygota typu B), dla których teoretyczny stosunek rozszczepień wynosi 1:2:1. Kombinacje krzyżowań, w których jeden z rodziców zawiera wariant kodujący, składający się z pojedynczej frakcji białkowej, a drugi zawiera null allel, stanowi — z punktu widzenia analizy genetycznej — szczególny przypadek. W potomstwie homozygoty zawierające wariant kodujący różnią się od heterozygot bardziej intensywnym wybarwieniem tylko jednej frakcji białkowej, co wynika z różnej liczby genów kodujących. Jednakże intensywność wybarwienia może być efektem działania różnych czynników, np. zróżnicowania zawartości białka w pojedynczych ziarniakach. Analiza elektroforetyczna jest typową analizą jakościową, a nie ilościową, i wnioskowanie o zawartości białka w danej frakcji — niezbędne dla prawidłowego odróżnienia homozygoty od heterozygoty — byłoby subiektywne i obciążone znacznym błędem. Dlatego analizując rozszczepienia podjednostek *Glu A1-1* i *Glu A1-2* w mieszańcach, w których allelicznym w stosunku do nich wariantem jest typ null, połączono grupy homozygot zawierających wariant kodujący z heterozygotami. W ten sposób dla każdej kombinacji utworzono dwie grupy genotypów (zawierających prążek i niezawierających prążka), i przyjęto teoretyczny stosunek rozszczepień 3:1.

Uzyskano zastanawiające wyniki, trudne do jednoznacznej interpretacji. Okazało się, że w pewnych kombinacjach krzyżowań wariant null zachowuje się jak typowy alleliczny wariant białkowy genu na chromosomie *1A*. Świadczą o tym obserwowane stosunki rozszczepień, które były zgodne z teoretycznie oczekiwanymi. Jednakże w innych kombinacjach obserwowana częstotliwość genotypów znacznie różniła się od teoretycznej. W skrajnych przypadkach stwierdzono nawet całkowitą eliminację form zawierających wariant kodujący (kombinacje z odmianą Tortija). W innych przypadkach obserwowano

tendencję odwrotną, eliminację bądź znaczne ograniczenie mieszańców zawierających null allel przez genotypy z wariantem kodującym (kombinacje z odmianą Mikon). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że obecność null alleli u jednego z komponentów rodzicielskich może w pewnych kombinacjach krzyżowań zmieniać, nawet w znaczący sposób, mechanizm dziedziczenia w pokoleniu F₂. Celem przyszłych badań będzie porównanie linii czystych zawierających podjednostki *Glu A1-1*, *Glu A1-2* oraz wariant null z wykorzystaniem metod cytogenetycznych i technik PCR. Zdaniem autorów wyniki tych badań mogą okazać się pomocne w wyjaśnieniu genetycznych przyczyn opisanego zjawiska.

Z literatury wynika, że warianty typu null dla różnych genów kodujących białka zapasowe pojawiają się u odmian i rodów pszenicy ozimej sporadycznie (Rogers i in., 2001). Niewiele jest publikacji opisujących sposób ich dziedziczenia. Tym bardziej interesujące wydaje się doniesienie, w którym stwierdzono wystąpienie podobnego zjawiska jak w niniejszej pracy (Lafiandra i in., 1985). Autorzy badając mieszańce odmiany Reader (zawierającej wariant null białek gliadynowych kodowanych chromosomem 6A) z linią zawierającą wariant kodujący tego genu obserwowali całkowitą jego eliminację, podobnie jak miało to miejsce w kombinacji z odmianą Tortija. Z kolei, gdy analizowano rozszczepienie białek gluteninowych zawierających wariant null dla wolno migrującej podjednostki typu „x” (kodowanej chromosomem 1D) stwierdzono odstępstwo od oczekiwanego stosunku rozszczepień 3:1. To może sugerować, że kontrowersyjne wyniki uzyskane w niniejszej pracy nie są kwestią przypadku czy błędu doświadczalnego, lecz odzwierciedlają specyficzną zdolność null alleli genów białek zapasowych do modyfikowania stosunków rozszczepień w niektórych kombinacjach krzyżowań. W świetle uzyskanych wyników wydaje się prawdopodobnym, iż jedną z możliwych przyczyn liczebnej dominacji null allela nad wariantami kodującymi w *locus Glu A1* u odmian i rodów hodowlanych pszenicy ozimej jest efekt działania specyficznego mechanizmu genetycznego.

WNIOSKI

1. W populacjach mieszańcowych F₂ uzyskanych z krzyżowań, w których jeden z komponentów rodzicielskich zawierał wariant kodujący, a drugi zawierał wariant niekodujący genów *locus Glu A1*, rozszczepienie alleli białek gluteninowych przebiegało bądź w sposób zgodny, bądź też znacznie odbiegało od teoretycznie oczekiwanego stosunku rozszczepień.
2. Zakłócenie teoretycznego stosunku rozszczepień mieszańców może istotnie ograniczać liczebność genotypów zawierających wariant kodujący w jednych, natomiast typ *Glu A1*-null w innych kombinacjach krzyżowań.
3. Uzyskane wyniki sugerują, iż specyficzny mechanizm dziedziczenia białek gluteninowych w przypadku allela *Glu A1*-null może być jedną z przyczyn jego znaczącej przewagi liczebnej wśród polskich odmian i rodów pszenicy ozimej.

LITERATURA

- Bietz J. A., Shepherd K. W., Wall J. S. 1975. Single kernel analysis of glutenin: use in wheat genetics and breeding. *Cereal Chem.* 52: 513 — 532.
- Gianibelli M. C., Larroque O. R., MacRitchie F., Wrigley C. W. 2001. Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem.* 78 (6):635 — 646.
- Lafiandra D., Splendido R., Tomassini C., Porceddu E. 1987. Lack of expression of certain storage proteins in bread wheats; distribution and genetic analysis of null forms. In: Laszity R., Bekes F. (eds.) *Proceedings 3rd International Workshop on Gluten Proteins*. Singapore: World Scientific Publishing:71 — 90.
- Lafiandra D., D'Ovidio R., Tanzarella O. A., Ciaffi M. 1991. Identification, molecular characterization and use of mutants for wheat storage proteins in quality wheats. In: *Gluten proteins 1990*. W. Bushuk and R. Tkachuk, (eds.). Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN: 537 — 544.
- Laemmli V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 — 685.
- Payne P. I., Lawrence G. J. 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci GluA1, GluB1, GluD1, which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.*, 11/1: 29 — 35.
- Payne P. I., Holt L. M., Jackson E. A., Law C. N. 1984. Wheat storage proteins: Their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Phill. Trans. Royal. Soc. London B* 304: 259 — 371.
- Rogers W. J., Sayers E. J., Ru K. L. 2001. Deficiency of individual high molecular weight glutenin subunits affords flexibility in breeding strategies for bread-making quality in wheat *Triticum aestivum* L. *Euphytica* 117:99 — 109.
- Waga J. 1997. Polimorfizm białek gliadynowych i gluteninowych a jakość pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.). *Biul. IHAR* 204: 205 — 218.
- Węgrzyn S., Waga J. 1999. Powiązanie białek gluteninowych ze zmiennością ważniejszych cech użytkowych odmian i rodów pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 211: 55 — 69.