

KRYSTYNA WITKOWSKA ¹
 EDWARD WITKOWSKI ¹
 TADEUSZ ŚMIAŁOWSKI ²
 JACEK WAGA ²

¹ HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR

² Zakład Roślin Zbożowych IHAR — PIB w Krakowie

Związek białek zapasowych z zimotrwałością u wybranych mieszańców pszenicy ozimej *

Relationship between wheat storage proteins and winter hardiness in chosen hybrids of winter wheat

Celem badań było poszukiwanie związków pomiędzy markerami biochemicznymi a stopniem przetrzymywania u 2 grup pszenic ozimych: 19 wieloliniowych genotypów (90 linii F₅) pochodzących z 6 kombinacji mieszańcowych pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum ssp. vulgare*) oraz trzech par genotypów wytworzonych z mieszańca orkiszowego (odmiany Oberkummer Rotkorn (*Triticum aestivum spelta* L.) i rodu LAD 480 (*T. aestivum ssp. vulgare*). Materiał poddano analizom elektroforetycznym. W pierwszej grupie badanego materiału stwierdzono silne zróżnicowanie pod względem zimotrwałości wahające się od 4 do 9 stopni (w skali 9°). Uzyskane wyniki sugerują, że kombinacja podjednostek HMW glutenin [*Glu A1*(Null), *Glu B1*(7+9), *Glu D1* (5+10)] jest powiązana z podwyższoną zimotrwałością pszenicy ozimej. Zimotrwałość drugiej grupy mieszańców oddalonych była niższa i wahała się od 1 do 5 stopnia. Markerami wysokiej zimotrwałości u tej grupy mieszańców okazał się blok białek gluteninowych z podjednostką HMW warunkowanych przez locus *Glu A1* z podjednostką „2” i locus *Glu D1* z podjednostką „5+10/2+12” oraz blok białek gliadynowych z podjednostkami zawierającymi markery białkowe linii z null allelem w locus *Gli B2*.

Słowa kluczowe: elektroforeza, markery biochemiczne, pszenica ozima, zimotrwałość

The aim of these studies was to find out whether polymorphic wheat storage proteins (gliadins and HMW glutenins) and winter hardiness are interrelated. Two sets of winter wheats were analyzed. In the first set 19 groups of hybrid genotypes (90 lines in total) of F₅ generation from cross combinations between common wheat (*Triticum aestivum ssp. vulgare*) cultivars and strains were analyzed. The second set comprised four pairs of hybrid genotypes originating from crossing between spelt (*Triticum aestivum ssp. spelta*, cv. Oberkummer Rotkorn) and common wheat breeding strain LAD 480. Gliadins and HMW glutenins extracted from individual kernels of analyzed hybrid genotypes were separated using electrophoretic techniques: A-PAGE and SDS-PAGE. The obtained results suggested close

* Część badań finansowana ze środków na naukę w latach 2010–2013 jako projekt badawczy nr N N310 162238

relationships between HMW glutenin subunits: *Glu A1-1*, *Glu B1-7+9/6+8*, *Glu D1-5+10* and gliadin null alleles localized on the chromosome *6B* (*locus Gli B2*) and winter hardiness of winter wheat.

Key words: electrophoresis, biochemical markers, winter wheat, winter hardiness

WSTĘP

Wysoka zimotrwałość zbóż ozimych jest jedną z ważniejszych cech w naszej szerokości klimatycznej. Udowodniły to warunki zimowe w 2012 roku, w którym niskie ujemne temperatury powietrza, jakie wystąpiły w styczniu i lutym, przy jednoczesnym braku okrywy śnieżnej, spowodowały niemal całkowite wymarzenie roślin pszenicy ozimej i jęczmienia ozimego na znacznym obszarze kraju. Warunki klimatyczne panujące w okresie zimy w Polsce na ogół uniemożliwiają wykonanie selekcji materiałów hodowlanych w polu pod względem zimotrwałości. Bada się zatem możliwość oceny tej cechy przy użyciu metod pośrednich, np. markerów biochemicznych czy molekularnych.

Wśród markerów biochemicznych na szczególną uwagę zasługują polimorficzne białka zapasowe ziarniaków pszenicy: gliadyny i gluteniny o wysokiej masie cząsteczkowej (HMW gluteniny) (Kączkowski, 2002). W ostatnich dziesięcioleciach obie grupy białek były przedmiotem intensywnych badań z uwagi na ich silny związek z cechami jakościowymi, głównie z właściwościami reologicznymi glutenu (Payne i in., 1987). Wykazano, że HMW gluteniny są odpowiedzialne za jego elastyczność natomiast gliadyny warunkują rozciągliwość, zaś końcowy efekt jakości pszenicy jest wypadkową obu tych cech (Popineau i in., 1997). Jednocześnie stwierdzono, że zmienność allelicznych wariantów kontrolujących syntezę gliadyn i HMW glutenin pozostaje w statystycznym związku także z innymi cechami użytkowymi, takimi jak: plon ziaren z kłosa, liczba ziaren z kłosa czy odporność na mączniaka (*Erysiphe graminis*) (Węgrzyn i Waga, 1999). Spośród cech użytkowych, powiązanych z odpornością na stropy abiotyczne, a jednocześnie powiązanych ze zmiennością frakcji i podjednostek białek zapasowych, na szczególną uwagę zasługuje zimotrwałość. Już wczesne prace Sozinova i Poperelli (1980) wykazały związek allelicznych wariantów białkowych ω-gliadyn kontrolowanych chromosomem *1D* ze zmiennością tej cechy. Badania nad polimorfizmem HMW glutenin w polskich rodach i odmianach pszenicy ozimej wskazały na znaczącą przewagę ilościową null allele genu na chromosomie 1A (*locus Glu A1*) nad innymi, allelicznymi wariantami tego genu kontrolującymi podjednostki *Glu A1-1* i *Glu A1-2**. Jednocześnie badania na populacjach mieszańcowych wykazały, że *locus Glu A1* jest sprzężony z jednym z genów odpowiadających za zimotrwałość, a nieaktywny wariant genu w tym *locus* jest sprzężony z genem poprawiającym zimotrwałość (Witkowski i in., 2008).

Celem niniejszych badań było określenie związku pomiędzy zmiennością allelicznych frakcji gliadyn i glutenin kontrolowanych przez geny zlokalizowane na chromosomach 1. i 6. grupy homeologicznej a zimotrwałością linii mieszańcowych ozimej pszenicy zwyczajnej i orkisz. Badania mogą poszerzyć spektrum markerów białkowych tej cechy użytkowej i stworzyć możliwości ich praktycznego wykorzystania w selekcji genotypów.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym były dwa zestawy pszenic ozimych. Pierwszy zestaw stanowiło 19 grup genotypów F_5 pochodzących z 6 kombinacji krzyżowań pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*) i 4 odmiany wzorcowe: Almari, Tonacja, KWS Ozon i Muszelka (tab. 1). Każda z grup zawierała po kilka spokrewnionych ze sobą linii, w sumie przebadano 90 linii i 4 wzorce. Analizowane linie były znacznie zróżnicowane pod względem stopnia przezimowania oraz składu podjednostek HMW glutenin *Glu A1*, *Glu B1* i *Glu D1*.

Drugi zestaw materiałów badawczych stanowiły trzy pary genotypów mieszańcowych wytworzonych z potomstwa kombinacji krzyżowań orkiszu — odmiany Oberkummer Rotkorn (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) i rodu LAD 480 (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*) (tab. 5). Jeden z dwóch genotypów w obrębie każdej pary zawierał null allel w jednym z sześciu *loci* kontrolujących syntezę gliadyn, natomiast drugi stanowił kontrolę zawierającą wszystkie geny gliadyn w postaci aktywnej. Każdy z rozpatrywanych genotypów obejmował od kilku do kilkunastu blisko spokrewnionych linii mieszańcowych. Opracowywane wyniki dotyczą oceny przezimowania w okresie styczeń — luty 2012 w HR Smolice. Warunki pogodowe (temperatura) przedstawiono na rysunku 1. Analizy elektroforetyczne oraz obliczenia statystyczne wykonano w Zakładzie Roślin Zbożowych IHAR PIB w Krakowie.

Analizy elektroforetyczne

Białka gliadynowe izolowano przy użyciu zmodyfikowanej elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w środowisku kwaśnym buforu mleczanowo-glinowego (A-PAGE) opracowanej przez Bushuka i Zillmana (1978). Bloki białek gliadynowych różnicujące badane genotypy pszenicy ozimej identyfikowano na podstawie katalogu opracowanego w Zakładzie Roślin Zbożowych IHAR w Krakowie (Waga, 2000). HMW gluteniny izolowano roztworem ekstrakcyjnym (6% mocznik, 2% SDS, 1,5% merkaptoetnolem), analizowano metodą elektroforezy SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Białka identyfikowano na podstawie katalogu Payne'a (Payne i Lawrence, 1983). Rysunek 3, prezentuje wybrane elektroforegramy białek gliadynowych analizowanych pszenic.

Analizy statystyczne

Wczesną wiosną w warunkach polowych wykonano ocenę zimotrwałości roślin w skali 9-stopniowej (9 — bardzo dobre, 1 — bardzo złe przezimowanie). Na podstawie uzyskanych wyników wykonano statystyki opisowe klasyfikujące każdą grupę białek gluteninowych oraz analizy wariancji. Statystyki opisowe obejmowały obliczenie średnich arytmetycznych, odchyłeń standardowych i współczynników zmienności dla badanych podjednostek HMW glutenin *Glu A1*, *Glu B1*, *Glu D1* oznaczonych dla 19 grup genotypów wieloliniowych F_5 pochodzących z 6 kombinacji krzyżowań i 4 odmian wzorcowych oraz dla glutenin *Glu A1*, *Glu B1* i *Glu D1* i gliadyn *Gli B1*, *Gli B2* i *Gli D1* oznaczonych dla 3 par genotypów wytworzonych z kombinacji krzyżowań orkiszu i pszenicy zwyczajnej. Do zbadania istotności zróżnicowania średnich zimotrwałości badanych 90 linii w stosunku do odmian wzorcowych wykorzystano test „t” Studenta. Testem tym sprawdzono również istotności zróżnicowania pomiędzy średnimi przezimowania prób różniących się składem

białek zapasowych w liniach pszenicy ozimej. Badano następujące kontrasty: 1- *Gli B1*-Null/kontrola-*Gli B1*, 2- *Gli B2-Null*/*Gli B2*-kontrola, 3- *Glu B1-6+8o*/*Glu B1-6+8*). Przyjęto założenie, że różnica pomiędzy średnimi równa się 0 a próby mają nierówne wariancje. Do obliczeń zastosowano programy: SAS® 9.13, oraz XLstat (2012).

WYNIKI I DYSKUSJA

W badanych 23 genotypach (19 wieloliniowych mieszańcach F₅ i 4 odmianach wzorcowych) pszenicy ozimej zidentyfikowano następujące podjednostki HMW glutenin: *Glu A1*: 1, 2, Null; *Glu B1*: 6+8, 7+8, 7+9; *Glu D1*: 5+10 oraz 2+12 (tab. 1). Liczebność linii w 9 klasach przezimowania 94 linii i odmian wzorcowych przedstawiono na histogramie (rys. 2). 12 spośród 19 grup genotypów wieloliniowych przewyższało lub prezentowało poziom zimotrwałości najlepszej odmiany wzorcowej Tonacji (tab. 1).

Tabela 1

Wykaz 19 grup genotypów i 4 odmian wzorcowych zróżnicowanych pod względem 3 markerów HMW uszeregowanych malejąco pod względem średniej wartości zimotrwałości
List of 19 groups of genotypes and 4 standard varieties differing in terms of 3 markers of HMW (in order of descending winter hardiness)

Genotypy Genotypes	No.	<i>Glu A1</i>					Średnia ocena zimotrwałości Mean winter hardiness	Odchylenie. standardowe Standard deviation	CV%
		L1	L2	L3	L4	L5			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01643-R-R-43	5	1	9,0	0,0	0,0	N	9,0	0,0	0,0
01643-R-R-52	5	N	9,0	0,0	0,0	N	9,0	0,0	0,0
01643-R-R-68	4	N	8,8	0,5	5,7		8,8	0,5	5,7
01643-R-R-20	5	N	8,6	0,5	6,4	N	8,6	0,5	6,4
01643-R-R-114	4	N	8,0	0,0	0,0		8,0	0,0	0,0
01509-R-R-29	5	N	7,2	1,3	18,1	N	7,2	1,3	18,1
01433-R-R-77	4	1+N	7,0	0,8	11,7		7,0	0,8	11,7
01508-R-R-13	5	1	6,6	2,5	38,0	1	6,6	2,5	38,0
01643-R-R-106	5	N	6,6	1,7	25,4	N	6,6	1,7	25,4
01509-R-R-5	5	1	6,2	2,0	33,1	1	6,2	2,0	33,1
01643-R-R-40	3	N	6,0	1,0	16,7		6,0	1,0	16,7
01643-R-R-59	5	N	6,0	2,3	39,1	N	6,0	2,3	39,1
01506-R-R-9	5	N	5,8	1,6	28,3	N	5,8	1,6	28,3
01508-R-R-24	5	1	5,8	1,8	30,8	N	5,8	1,8	30,8
01433-R-R-72	5	1	5,6	2,3	41,1	1	5,6	2,3	41,1
01478-R-R-34-1	5	2	5,6	2,1	37,0	N	5,6	2,1	37,0
01506-R-R-17	5	N	5,6	2,1	37,0	N	5,6	2,1	37,0
01643-R-R-103	5	N	4,8	1,8	37,3	N	4,8	1,8	37,3
01643-R-R-34-2	5	N	4,0	1,2	30,6	N	4,0	1,2	30,6
Tonacja	1	N	6,0	0,0	0,0		6,0	0,0	0,0
Almari	1	N	4,0	0,0	0,0		4,0	0,0	0,0
Ozon	1	1	3,0	0,0	0,0		3,0	0,0	0,0
Kris	1	1	2,0	0,0	0,0		2,0	0,0	0,0

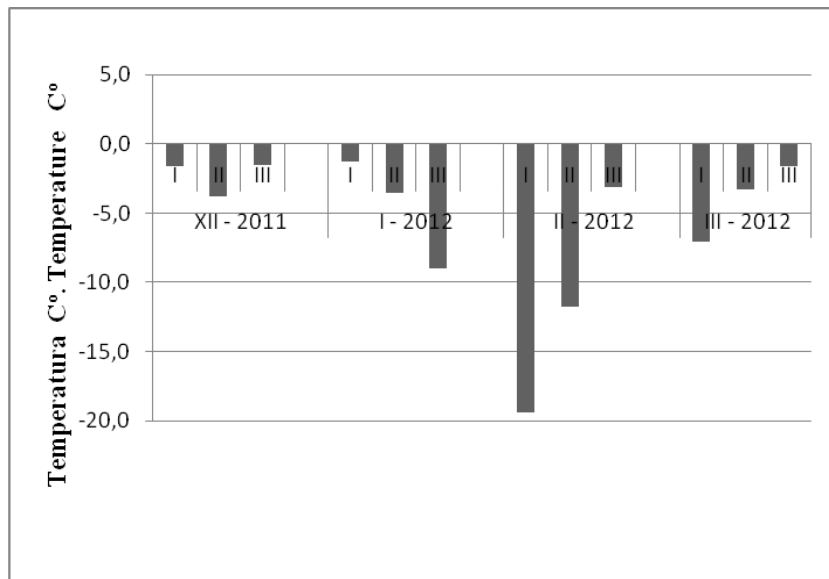
c.d. Tabela 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		<i>Glu B1</i>							
		L1	L2	L3	L4	L5			
01643-R-R-43	5	7+9	9,0	0,0	0,0	7+9	9,0	0,0	0,0
01643-R-R-52	5	7+9	9,0	0,0	0,0	7+9	9,0	0,0	0,0
01643-R-R-68	4	7+9	8,8	0,5	5,7		8,8	0,5	5,7
01643-R-R-20	5	7+8	8,6	0,5	6,4	7+8	8,6	0,5	6,4
01643-R-R-114	4	7+9	8,0	0,0	0,0		8,0	0,0	0,0
01509-R-R-29	5	6+8	7,2	1,3	18,1	6+8	7,2	1,3	18,1
01433-R-R-77	4	6+8	7,0	0,8	11,7		7,0	0,8	11,7
01508-R-R-13	5	7+9	6,6	2,5	38,0	7+9/6+8	6,6	2,5	38,0
01643-R-R-106	5	7+9	6,6	1,7	25,4	7+9	6,6	1,7	25,4
01509-R-R-5	5	7+9	6,2	2,0	33,1	7+9	6,2	2,0	33,1
01643-R-R-40	3	7+8/7+9	6,0	1,0	16,7		6,0	1,0	16,7
01643-R-R-59	5	7+8	6,0	2,3	39,1	7+8	6,0	2,3	39,1
01506-R-R-9	5	6+8	5,8	1,6	28,3	6+8	5,8	1,6	28,3
01508-R-R-24	5	6+8	5,8	1,8	30,8	6+8	5,8	1,8	30,8
01433-R-R-72	5	6+8	5,6	2,3	41,1	6+8	5,6	2,3	41,1
01478-R-R-34-1	5	7+8	5,6	2,1	37,0	7+8	5,6	2,1	37,0
01506-R-R-17	5	6+8	5,6	2,1	37,0	6+8	5,6	2,1	37,0
01643-R-R-103	5	7+9	4,8	1,8	37,3	7+9	4,8	1,8	37,3
01643-R-R-34-2	5	7+8	4,0	1,2	30,6	7+9	4,0	1,2	30,6
Tonacja	1	7+9	6,0	0,0	0,0		6,0	0,0	0,0
Almari	1	6+8	4,0	0,0	0,0		4,0	0,0	0,0
Ozon	1	7+9	3,0	0,0	0,0		3,0	0,0	0,0
Kris	1	7+9	2,0	0,0	0,0		2,0	0,0	0,0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		<i>Glu D1</i>							
		L1	L2	L3	L4	L5			
01643-R-R-43	5	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	9,0	0,0	0,0
01643-R-R-52	5	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	9,0	0,0	0,0
01643-R-R-68	4	5+10	5+10	5+10	5+10		8,8	0,5	5,7
01643-R-R-20	5	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	8,6	0,5	6,4
01643-R-R-114	4	5+10	5+10	5+10	5+10		8,0	0,0	0,0
01509-R-R-29	5	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	7,2	1,3	18,1
01433-R-R-77	4	2+12	2+12	2+12	2+12		7,0	0,8	11,7
01508-R-R-13	5	5+10/2+12	5+10/2+12	2+12	5+10	5+10/2+12	6,6	2,5	38,0
01643-R-R-106	5	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	6,6	1,7	25,4
01509-R-R-5	5	5+10/2+12	5+10	5+10/2+12	5+10/2+12	2+12	6,2	2,0	33,1
01643-R-R-40	3	5+10	5+10	5+10			6,0	1,0	16,7
01643-R-R-59	5	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	6,0	2,3	39,1
01506-R-R-9	5	2+12	2+12	2+12	2+12	2+12	5,8	1,6	28,3
01508-R-R-24	5	5+10	5+10	5+10/2+12	5+10/2+12	5+10	5,8	1,8	30,8
01433-R-R-72	5	2+12	2+12	2+12	2+12	2+12	5,6	2,3	41,1
01478-R-R-34-1	5	5+10	5+10	5+10	2+12	5+10	5,6	2,1	37,0
01506-R-R-17	5	2+12	2+12	2+12	2+12	2+12	5,6	2,1	37,0
01643-R-R-103	5	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	4,8	1,8	37,3
01643-R-R-34-2	5	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	4,0	1,2	30,6
Tonacja	1	2+12					6,0	0,0	0,0
Almari	1	2+12					4,0	0,0	0,0
Ozon	1	5+10					3,0	0,0	0,0
Kris	1	2+12					2,0	0,0	0,0

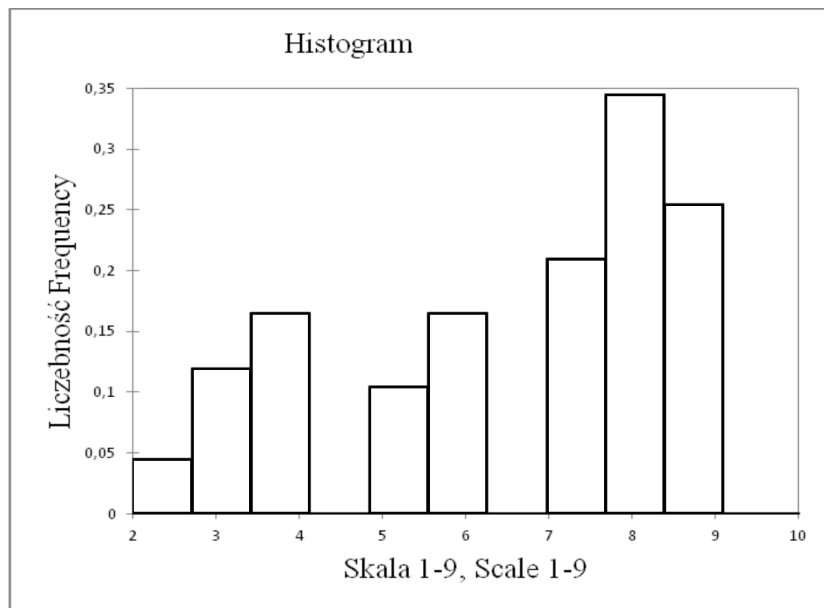
N — liczba linii; Number of lines

L1,L2...Ln — linie w grupie; Lines in group



Rys. 1. Średnie dekadowe temperatury przy gruncie od 1 grudnia 2011 do 31 marca 2012 roku w Smolicach

Fig. 1. Average ground temperature of decades from 1 December 2011 to 31 March 2012 in Smolice



Rys. 2. Histogram rozkładu stopnia oceny przetrzymywania dla badanych 90 linii i odmian wzorcowych pszenicy ozimej

Fig. 2. Frequency distribution of winter hardiness for investigated 90 lines and standard varieties of winter wheat

Poziom przezimowania wahał się od maksymalnych wartości (ocena — 9) dla genotypów: 01643-R-R-43 i 01643-R-R-52 do niskich dla genotypu 01643-R-R-34 (ocena — 4) (tab. 1). Genotypy wieloliniowe były na ogół wyrównane pod względem zimotrwałości, ale kilka okazało się wewnątrznie zróżnicowanych np. genotyp 01433-R-R-72 (CV = 41,1%). Przeprowadzona analiza elektroforetyczna ujawniła, że linie z grup o kolejnych numerach: 1, 2, 3, 5, 9 miały taki sam układ podjednostek HMW [*Glu A1* (N), *Glu B1* (7+9) i *Glu D1* (5+10)], linie 4 i 12 miały *Glu A1* (Null), *Glu B1* (7+8), *Glu D1* (5+10), i 13 i 17 *Glu A1* (Null), *Glu B1* (6+8) i *Glu D1* (2+12). Linie pozostałych grup genotypów różniły się od siebie często jedną podjednostką HMW. Test „t” Studenta ujawnił, że badane linie istotnie różniły się stopniem przezimowania od czterech odmian wzorowych (tab. 2).

Tabela 2

Zróżnicowanie zimotrwałości 19 genotypów F₅ pszenicy ozimej w stosunku do odmian wzorowych oszacowane testem „t” Studenta
Differentiation of winter hardiness of 19 winter wheat hybrid F₅ genotypes in relation to standard varieties assessed by test „t” Student

Objekt Object	N	Średnia ocena zimotrwałości Mean winter hardiness	σ^2	t	P
Genotyp — Genotype	19	6,64	2,10	3,15	<0,05
Worzec — Standard	4	3,75	2,92		

Czy oznaczone podjednostki HMW mogą być zatem markerami zimotrwałości? Krytyczne warunki zimowe w roku 2012 na przełomie stycznia i lutego (rys. 1) sprzyjały ujawnieniu zróżnicowanej mrozoodporności i zimotrwałości pszenicy ozimej. Skutki tych warunków znalazły odbicie również w analizowanych pod względem glutenin mieszańcach pszenic ozimych.

Wysoką lub niską zimotrwałością charakteryzowały się genotypy niezróżnicowane pod względem podjednostek HMW jak i zróżnicowane przynajmniej jedną podjednostką HMW, np. u genotypów: 01643-R-R-43, 01643-R-R-52 i 01643-R-R-106 o identycznym składzie podjednostek — *Glu: A1, Glu B1, Glu D1*, zimotrwałość wyniosła odpowiednio 9,0, 9,0 i 6,6 stopnia w skali dziewięciostopniowej (tab. 1). Poszukując związku pomiędzy wysoką zimotrwałością a zróżnicowaniem składu wysokocząsteczkowych białek zapasowych przeprowadzono klasyfikację na podstawie której przypisano średnie wartości przezimowania do poszczególnych podjednostek badanych glutenin oraz wykonano ocenę zmienności pod względem zimotrwałości dla tych podjednostek (tab. 3). Stwierdzono wysokie zróżnicowanie zimotrwałości kilku podjednostek: gluteniny *Glu A1* dla podjednostki „2” = 47,14% CV, oraz *Glu D1* dla podjednostki „5+10/2+12” = 37,3 CV% (tab. 4). Rozpiętość zimotrwałości okazała się zatem duża, co oznacza, że wśród badanych genotypów istnieje możliwość wyboru linii o kombinacji podjednostek HMW, które mogłyby być wykorzystane jako markery zimotrwałości. Przeprowadzona statystyka agregująca (tab. 4) dla podjednostek HMW ujawniła, że wysoką zimotrwałością (ocena 8,0) charakteryzował się unikalny poziomy układ podjednostek [*Glu A1* (2), *Glu B1* (7+8), *Glu D1* (5+10)].

Tabela 3

Ocena stopnia zimotrwałości linii pszenicy ozimej zróżnicowanych pod względem składu białek zapasowych loci *GluA1*, *GluB1* i *GluD1*
The winter resistance of winter wheat lines differing in the composition of storage protein loci *GluA1*, *GluB1* and *GluD1*

Poziom Level	N	Zimotrwałość Winter resistance		CV (%)
		średnia ocena zimotrwałości mean winter resistance	odchylenie standardowe standard deviation	
<i>Glu A1</i>				
1	19	5,58	2,22	39,77
1+N	4	7,00	0,82	11,66
2	2	6,00	2,83	47,14
N	69	6,72	2,06	30,59
<i>Glu B1</i>				
6+8	28	5,79	1,79	30,97
7+8	14	6,86	2,18	31,77
7+8/7+9	3	5,33	1,15	21,65
7+9	44	6,84	2,25	32,91
7+9/6+8	5	7,00	1,73	24,74
<i>Glu D1</i>				
2+12	24	5,71	1,90	33,27
5+10	62	6,82	2,08	30,55
5+10/2+12	8	6,25	2,31	37,03

N — Liczebność

N — Number

Tabela 4

Zimotrwałość blisko spokrewnionych linii pszenicy ozimej zróżnicowanych pod względem loci *GluA1*, *GluB1* i *GluD1*

Winter hardness of closely related hybrid lines differing in loci *GluA1*, *GluB1*, *GluD1*

Glu A1	Glu B1	Glu D1	Liczba obs. No. obs.	Średnia Mean	Odchylenie standardowe Standard deviation	Błąd standardowy Standard error	Minimum Min.	Maksimum Max.	Współczynnik wariancji CV (%)
Podjednostki HMW Subunits HMW									
1+N	6+8	2+12	4	7,00	0,82	0,41	6,00	8,00	11,66
1	6+8	5+10	2	7,50	0,71	0,50	7,00	8,00	9,43
		2+12	3	4,00	1,41	1,00	3,00	5,00	35,36
	7+9	5+10	3	7,25	1,71	0,85	5,00	9,00	23,56
		2+12	3	6,67	2,31	1,33	4,00	8,00	34,64
		5+10/2+12	9	6,44	2,07	0,69	3,00	9,00	32,09
2	7+9/6+8	5+10/2+12	2	6,00	2,83	2,00	4,00	8,00	47,14
		6+8	1	4,00	.	.	4,00	4,00	.
	7+8	5+10	1	8,00	.	.	8,00	8,00	.
		2+12	14	6,08	1,75	0,49	2,00	8,00	28,87
N	6+8	5+10	4	5,00	2,65	1,53	3,00	8,00	52,92
		2+12	14	6,08	1,75	0,49	2,00	8,00	28,87
		7+8	13	6,77	2,24	0,62	3,00	9,00	33,12
	7+8/7+9	5+10	3	5,33	1,15	0,67	4,00	6,00	21,65
	7+9	5+10	32	7,28	2,10	0,39	2,00	9,00	28,90

N — liczebność , N — number

Obiecujący okazał się również układ podjednostek [*Glu A1*(1), *Glu B1* (6+8), *Glu D1* (5+10)], których średnia zimotrwałość wyniosła 7,5. Podobnie układ podjednostek [*Glu*

Al(1), *Glu B1* (7+9), *Glu D1* (5+10)] wykazał się również wysokim przeciętnym przezimowaniem (ocena 7,3) (tab. 4). Liczebność linii powyższych układów jest jednak niewielka, dlatego ryzykownym jest twierdzenie, że mogą one być dobrymi markerami zimotrwałości. Stwierdzony u licznej grupy badanych linii pszenicy ozimej (32 obiekty) układ podjednostek [*Glu A1* (Null), *GluB1* (7+9), *Glu D1* (5+10)] o wysokim przeciętnym przezimowaniu (7,28) może być przydatny jako marker tej cechy (tab. 4).

Drugi zestaw materiałów roślinnych obejmował trzy pary blisko spokrewnionych genotypów mieszańcowych (tab. 5).

Tabela 5

Grupa materiałów badawczych stanowiąca cztery pary genotypów mieszańcowych wytworzonych z potomstwa kombinacji krzyżowań orkiszu Oberkummer Rotkorn i pszenicy wycyzajnej LAD 480
The group of hybrids obtained from crosses between spelt (varieties Oberkummer Rotkorn) and wheat line LAD 480

Lp. No.	Frakcje białkowe Protein fractions	Liczba linii Number of lines
1	<i>GliB1 GluB1</i>	42
2	<i>GliB2</i>	150
3	<i>GliD1.1</i>	47
4	<i>GliD1.2</i>	37
Razem Total		276

Dwie z trzech porównywanych par różniły się składem frakcji białek gliadynowych kontrolowanych chromosomami *1B* i *6B*. Jeden z dwóch genotypów w obrębie każdej pary stanowił linię kontrolną zawierającą pełny zestaw sześciu genów gliadynowych w postaci aktywnej, natomiast drugi genotyp w obrębie każdej z obu par zawierał null allel — w *locus Gli B1* oraz *Gli B2*. Trzecia para porównywanych linii różniła się składem podjednostek HMW glutenin — jeden genotyp zawierał podjednostki *Glu B1-6+8*, natomiast drugi zawierał charakterystyczną dla orkiszu parę podjednostek *Glu B1-6+8o* (oznaczenie własne). Badane obiekty charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem pod względem zimotrwałości (tab. 6).

Tabela 6

Zimotrwałość blisko spokrewnionych linii mieszańcowych zróżnicowanych pod względem loci *Gli B1*, *Gli B2* i *Gli D1*
Winter hardiness of closely related hybrid lines differing in loci *Gli B1*, *Gli B2* and *Gli D1*

<i>Loci</i>	1	2	3	<i>Loci</i>	4	5	<i>Loci</i>	6	7	<i>Loci</i>	8	9
<i>Glu A1</i>	N	N	N	<i>Glu A1</i>	1	1	<i>Glu A1</i>	1	1.	<i>Glu A1</i>	N	N
<i>Glu B1</i>	6+8o	6+8	6+8o	<i>Glu B1</i>	7+9	7+9	<i>Glu B1</i>	7+9	7+8	<i>Glu B1</i>	7+8	7+8
<i>Glu D1</i>	5+10	5+10	5+10	<i>Glu D1</i>	5+10	5+10	<i>Glu D1</i>	5+10	2+12	<i>Glu D1</i>	2+12	2+12
<i>Gli B1</i>	<i>B1 Null</i>	<i>B1 K</i>	<i>B1 K</i>	<i>Gli B2</i>	<i>B2N</i>	<i>B2K</i>	<i>Gli D1</i>	<i>D1 K1</i>	<i>D1N1</i>	<i>Gli D1</i>	<i>D1N 2</i>	<i>D1K2</i>
Średnie wartość Means values	1,7	5,0	1,6		5,7	1,3		1,1	2,8		1,3	1,0

Poziom zimotrwałości nie był wprawdzie zbyt wysoki (najwyższe wartości 5,0 i 5,7 w skali 9°), ale sygnalizuje możliwość wykorzystania markerów białkowych do selekcji

mieszańców pszenicy ozimej na wstępnych etapach hodowli pod względem mrozoodporności i zimotrwałości.

Na podstawie testu „t” Studenta (tab. 7) stwierdzono istotne zróżnicowanie zimotrwałości w parach genotypów różniących się pod względem frakcji gliadynowych kontrolowanych chromosomem 6B oraz podjednostek HMW gluteninowych kontrolowanych chromosomem 1B. Uzyskane wyniki wskazują na znacząco wyższą zimotrwałość linii zawierających null allel w *locus Gli B2* oraz dla linii zawierających typowe dla pszenicy zwyczajnej podjednostki 6+8 HMW glutenin kontrolowane chromosomem 1B (podjednostki orkiszu sugerują znacznie słabszą zimotrwałość). O ile związek gliadyn i HMW glutenin z cechami jakościowymi jest wynikiem specyficznej struktury 1.- 2.- i 3.- rzędowej tych białek to wykazany związek z zimotrwałością jest efektem sprzężenia przynajmniej niektórych spośród genów warunkujących tę cechę z *loci* białek zapasowych na chromosomach 1.- i 6.- grupy homeologicznej. Uzyskane wyniki wskazują na sprzężenie genów zimotrwałości z *loci Gli B1* oraz *Glu B1* (analiza genetyczna sprzężenia będzie przedmiotem przyszłych badań) a przede wszystkim poszerzają zakres informacji na temat związku białek zapasowych pszenicy ozimej z zimotrwałością. Na podstawie badań proteomicznych stwierdzono, że niektóre domeny polipeptydów gliadynowych wykazują znaczne analogie z sekwencjami niektórych białek szoku termicznego stanowiąc specyficzny przykład plejotropii (Blumenthal i in., 1990).

Tabela 7

Zróżnicowanie stopnia zimotrwałości w liniach mieszańcowych pszenicy ozimej zróżnicowanych pod względem składu białek zapasowych na podstawie średnich wartości oszacowanych testem „t” Studenta

Variation of the mean winter hardiness of winter wheat hybrid lines differing in the composition of storage proteins, on the basis of the „t” Student test

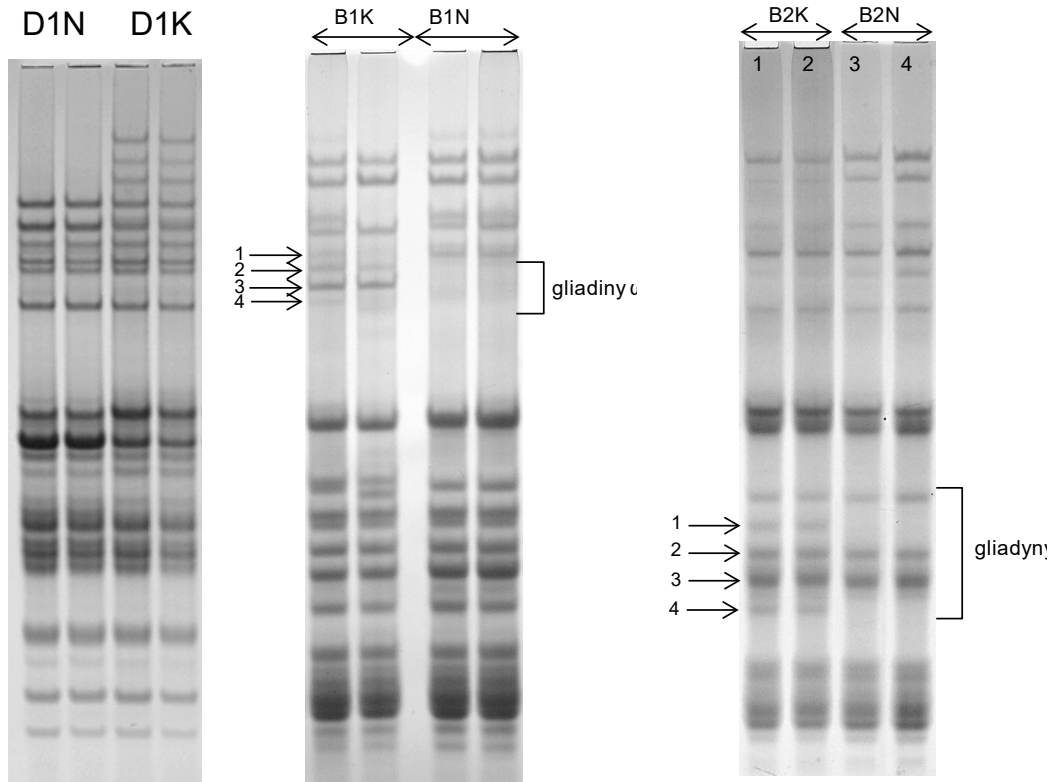
Frakcje białkowe Protein fractions	No.	Średnia zimotrwałość Mean winter hardiness	σ^2	<i>t</i>	P
			σ^2	<i>T</i>	P
<i>Gli B1</i> -Null	20	1,700	0,432	0,443	>0,05
<i>Gli B1</i> -Kontrola	14	1,571	0,879		
<i>Gli B2</i> -Null	88	5,682	0,495	47,246	<0,001
<i>Gli B2</i> -Kontrola	62	1,258	0,195		
<i>Glu B1</i> -6+8o	20	1,700	0,432	22,465	<0,001
<i>Glu B1</i> -6+8	8	5,000	0,000		

N — liczebność linii

N — Number of lines

Na podstawie badań proteomicznych stwierdzono, że niektóre domeny polipeptydów gliadynowych wykazują znaczne analogie z sekwencjami niektórych białek szoku termicznego (Blumenthal i in., 1990). Fakt ten sugeruje możliwość istnienia związków o charakterze ewolucyjnego pokrewieństwa genów kontrolujących syntezę białek zapasowych pszenicy i genów odporności na niekorzystne warunki przezimowania co dodatkowo może tłumaczyć powiązanie między zmiennością gliadyn i HMW glutenin a zimotrwałością. Można przypuszczać, iż kontynuacja badań opisanych w niniejszej pracy pozwoli zidentyfikować znacznie większą grupę frakcji białek zapasowych pszenicy

powiązanych z zimotrwałością, a w konsekwencji umożliwi bardziej precyzyjny i kontrolowany dobór komponentów rodzicielskich do krzyżowań, ułatwiający wytwarzanie genotypów łączących cechę podwyższonej odporności na niekorzystne warunki zimowania roślin z cechą wysokiej jakości technologicznej.



Rys. 3. Wybrane elektroforegramy białek gliadynowych dla pszenic ozimych ze Smolice
 Fig. 3. Gliadin proteins electrophoregrams for winter wheat from Smolice

WNIOSKI

1. Powiązanie wyników analizy elektroforetycznej badanych materiałów ze stopniem ich przetrwania umożliwiło sprawdzenie tezy o przydatności pośrednich biochemicznych metod do selekcji zimotrwałych materiałów hodowlanych. Rezultaty tych badań poszerzają również zakres informacji na temat związku białek zapasowych pszenicy z zimotrwałością.
2. Stwierdzono istotne zróżnicowanie pod względem zimotrwałości wśród 19 wieloliniowych grup genotypów pszenicy ozimej. Najwyższy poziom przetrwania (ocena — 9) ujawnił się u 3 genotypów wieloliniowych pszenic ozimych: 01643-R-R-43 i

- 01643-R-R-52, 01643-R-R-68 o układzie podjednostek [*Glu A1*(Null), *Glu B1* (7+9), *Glu D1* (5+10)].
3. Uzyskane wyniki sugerują, że kombinacja podjednostek HMW glutenin: *Glu A1*-N, *Glu B1*-(7+9) oraz *Glu D1*-5+10 jest powiązana z podwyższoną zimotrwałością pszenicy ozimej.
 4. Null allele białek gliadynowych zlokalizowane na chromosomie 6B (*locus Gli B2*), powstałe jako efekt spontanicznych mutacji w mieszańcowym potomstwie orkiszu i pszenicy zwyczajnej, mogą być wykorzystane w hodowli jako markery podwyższonej zimotrwałości.
 5. Badania powinny być kontynuowane ze względu na brak skutecznych i prostych pośrednich metod oceny mrozoodporności i zimotrwałości przeznaczonych do masowego przesiewowego testowania materiałów hodowlanych pszenic ozimych.

LITERATURA

- Blumenthal C. S., Batey I. L., Bekes F., Wrigley C. W., Barlow E. W. R. 1990. Gliadin genes contain heat shock elements: Possible relevance to heat induced changes in grain quality. *J. Cereal Sci.* 11: 185 — 187.
- Bushuk W., Zillman R. R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can. J. Plant Sci.* 58: 505 — 515.
- Kączkowski J. 2002. Nowe poglądy na strukturę i funkcje białek zapasowych zbóż na przykładzie pszenicy (*Triticum aestivum* L.). *Biul. IHAR* 223/224: 3 — 31.
- 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 *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.* 11/1: 29 — 35.
- Payne P. I., Nightingale M. A., Krattiger A. F., Holt L. M. 1987. The relationship between HMW glutenin subunits composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40: 51 — 65.
- Popineau Y., Cornec M., Lefebvre J., Marchylo B. 1994. Influence of high *Mr* glutenin subunits on gluten polymers and rheological properties of glutens and gluten sub-fractions of near-isogenic lines of wheat Siccio. *J. Cereal Sci.* 19: 231 — 241.
- Sozinov A. A., Poperella F. A. 1980. Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding. *Ann. Techn. Agric.* 28: 229 — 245.
- Waga J. 2000. Syntetyczna metoda klasyfikacji białek gliadynowych. *Biul. IHAR* 215: 35 — 60.
- Węgrzyn S., Waga J. 1999. Powiązanie białek gluteninowych ze zmiennością ważniejszych cech użytkowych odmian i rodów pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 211: 55 — 69.
- Witkowski E., Waga J., Witkowska K., Rapacz M., Gut M., Bielawska A., Lubert H., Łukaszewski A. J. 2008. Association between frost tolerance and the alleles of high molecular weight glutenin subunits present in Polish winter wheats. *Euphytica* 159: 337 — 384.