

JACEK WAGA

Zakład Roślin Zbożowych

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Krakowie

Charakterystyka oraz dziedziczenie białek gliadynowych pszenicy ozimej pochodzącej z Nepalu

Characteristics and inheritance of gliadin proteins in winter wheat genotype coming from Nepal

W pracy przedstawiono charakterystykę kilku specyficznych frakcji białek gliadynowych obserwowanych u pszenicy ozimej pochodzącej z Nepalu. Wykonano kombinacje krzyżowań pomiędzy linią Nepal 1 (zawierającą nowe kombinacje gliadyn), a genotypem wzorcowym KBH 499 (zawierającym frakcje zidentyfikowane). Na podstawie analizy rozszczepienia genów w pokoleniu F₂ opisano cztery bloki białkowe kontrolowane chromosomami: 1B, 1D, 6B i 6D. Oznaczono je symbolami: *Gli B1-7*, *Gli D1-1.3*, *Gli B2-5*, *Gli D2-4* zgodnie z nomenklaturą zastosowaną we wcześniejszych pracach. Nowe bloki białek gliadynowych przedstawione w postaci graficznej zostały wprowadzone do katalogu opracowanego w Zakładzie Roślin Zbożowych IHAR-PIB (ZRZb IHAR-PIB).

Słowa kluczowe: elektroforeza A-PAGE, pszenica, bloki białek gliadynowych, analiza rozszczepienia genów

In the present work a set of specific proteins, observed in winter wheat genotype imported from Nepal, was characterized. F₂ generation coming from the cross combination between wheat line Nepal 1 (containing specific, investigated protein variants) and Polish winter wheat KBH 499 (containing standards of precisely characterized proteins) was obtained. Based on segregation analysis of gliadin genes in hybrid population some new gliadin blocks were identified. They are controlled by the chromosomes 1B, 1D, 6B, 6D and described by the symbols: *Gli B1-7*, *Gli D1-1.3*, *Gli B2-5*, *Gli D2-4*. Novel proteins were plotted and introduced into the existing catalogue of gliadin protein blocks, worked out at the Cereals Department of Plant Breeding and Acclimatization Institute.

Key words: A-PAGE, wheat, gliadin protein blocks, segregant analysis

WSTĘP

Gliadyny stanowią silnie zróżnicowaną grupę białek zapasowych pszenicy warunkowanych przez poligeniczne *loci* na chromosomach 1A, 1B, 1D, 6A, 6B i 6D (*Gli-1* oraz *Gli-2*). Każdy *locus* zbudowany jest z kilkunastu, niekiedy kilku do kilkunastu genów tworzących serie alleli wielokrotnych, kontrolujących syntezę polipeptydów

określanych jako bloki białek gliadynowych (Sozinov i Poperella, 1980; Payne, 1987). W pracach genetycznych bloki są identyfikowane na podstawie obrazów uzyskanych metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w środowisku kwaśnym bez form mleczanowo-glinowego (A-PAGE: Acid Polyacrylamide Gel Electrophoresis), a następnie archi wizowane w postaci katalogów. Katalog opracowany przez Metakowskiego obejmuje ponad 100 wariantów białkowych dla chromosomów pierwszej i szóstej grupy homeologicznej (Metakovsky, 1991 a). Biorąc pod uwagę, iż allele białek gliadynowych zlokalizowane na różnych chromosomach dziedziczą się w sposób niezależny, liczba wszystkich możliwych kombinacji sześciu bloków przekracza 300 milionów. Oznacza to, iż na podstawie katalogu Metakowskiego można opisać ponad 300 milionów genotypów pszenicy (Metakovsky i Graybosch, 2006). Tak szeroki zakres zmienności, niezależnej od warunków środowiska, pozwala efektywnie stosować metodę elektroforezy A-PAGE w badaniach genetycznych i hodowlanych. Udowodniony związek niektórych bloków z cechami jakościowymi daje możliwość wykorzystania allelicznych wariantów gliadyn w programach krzyżowań jako markerów wspomagających selekcję korzystnych mieszańców pod względem właściwości technologicznych (Sozinov i Poperella, 1980; Waga i Węgrzyn, 2000).

W ZRZb IHAR-PIB w Krakowie opracowano własną wersję katalogu bloków białek gliadynowych. Jego pierwotnym założeniem była charakterystyka bloków najczęściej obserwowanych wśród polskich odmian i rodów pszenicy (Waga, 2007). Jednakże genotypy wytwarzane w procesie hodowli nowych odmian zawierają niejednokrotnie specyficzne, nie obserwowane wcześniej kombinacje białek. Warunkiem wprowadzenia ich do katalogu jest ściśle zdefiniowanie, które spośród sześciu chromosomów pierwszej i szóstej grupy homeologicznej kontrolują syntezę poszczególnych prążków obrazu elektroforetycznego, oraz które z obserwowanych prążków tworzą bloki białkowe. Uzyskanie tych informacji jest możliwe na podstawie analizy rozszczenia genów w pokoleniu F₂ lub F₃. Komponenty rodzicielskie używane do krzyżowań w ramach badań nad identyfikacją nowych bloków powinny różnić się składem frakcji gliadynowych w taki sposób, aby jeden z nich zawierał prążki możliwie jak najdokładniej poznane, scharakteryzowane i opisane, natomiast drugi - prążki specyficzne, będące przedmiotem analizy. W późniejszych pokoleniach analiza mieszańców, a w szczególności blisko spokrewnionych biotypów, różniących się jedną parą alleli określonego genu, pozwala uściślić obraz białek w obrębie zidentyfikowanych bloków (Metakovsky, 1991 b). Ocena zróżnicowania gliadyn na podstawie analizy porównawczej biotypów pozwala dodatkowo zweryfikować poprawność identyfikacji bloków. Taka procedura jest najbardziej obiektywną i wiarygodną metodą klasyfikacji gliadyn (ICC Standard 143, 1995).

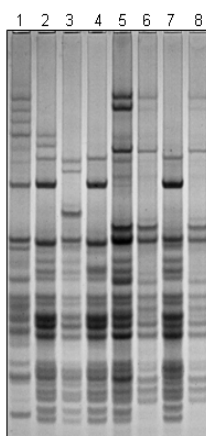
Aktualnie w ZRZb IHAR — PIB realizowane są prace nad rozszerzeniem istniejącego katalogu o frakcje specyficzne obserwowane u starych form pszenicy oraz w populacjach lokalnych pochodzących z innych kontynentów. Formy takie są ważnym źródłem zmienności genetycznej oraz mają szczególne znaczenie w pracach nad oceną i zachowaniem bioróżnorodności (Metakovsky i in., 2000). Analiza lokalnej populacji pszenicy ozimej uprawianej w Nepalu wykazała obecność nietypowych frakcji gliadynowych, których nie obserwowano dotychczas wśród materiałów hodowlanych badanych w Polsce. Celem niniejszej pracy było określenie sposobu dziedziczenia genów warunkujących

syntezę tych specyficznych białek, a także identyfikacja oraz charakterystyka nowych bloków, które zilustrowane w postaci graficznej mogłyby zostać włączone do katalogu utworzonego w trakcie wcześniejszych badań.

MATERIAŁ I METODY

Material roślinny

Material do badań uzyskano z Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR — PIB w Radzikowie. Próbę ziarniaków pszenicy ozimej z Nepalu poddano wstępnej analizie z wykorzystaniem elektroforezy A-PAGE, która wykazała znaczny stopień polimorfizmu badanej formy (rys. 1 a).



Rys. 1 a. Polimorfizm białek gliadynowych u pszenicy ozimej z Nepalu, obserwowany na podstawie elektroforezy A-PAGE pojedynczych ziarniaków. Linia czysta wytworzona na bazie genotypu przedstawionego w pozycji 7 została użyta w badaniach jako komponent rodzicielski do krzyżowań
Fig. 1 a. Polymorphism of gliadin proteins observed among winter wheat genotype coming from Nepal, based on A-PAGE of individual kernels. Pure line obtained from genotype 7 was used as parental component for cross combinations

Na podstawie uzyskanych obrazów elektroforetycznych wykonano selekcję pojedynczych ziarniaków, które w 2005 roku rozmnożono na poletkach ZRZb IHAR. Z uwagi na wciąż obserwowane różnicowanie obrazów elektroforetycznych gliadyn w obrębie wytwarzanych linii, wykonano dwukrotnie reSelekcję pojedyneków. W roku 2007 uzyskano stabilny genetycznie biotyp (określony jako „Nepal 1”) zawierający kombinację prązków oznaczoną numerem 7 (rys. 1 a), który przekrzyżowano z linią KBH 499 wytworzoną w latach wcześniejszych w ramach badań statutowych w ZRZb IHAR-PIB, i charakteryzowaną pod kątem składu frakcji gliadyn. Linia KBH 499, która jest mieszańcem orkisz (odmiana Oberkummler Rotkorn) oraz pszenicy zwyczajnej (ród LAD 480), wykazuje charakterystyczny brak kilku prązków w strefie β -gliadyn. W kontekście analizy rozszczepienia genów jest to cecha ułatwiająca obserwację badanego potomstwa pod

kątem zróżnicowania obrazów elektroforetycznych przez co zwiększa się wiarygodność uzyskiwanych wyników. Wytworzony materiał badawczy: ziarniaki pokolenia F₂ przeznaczono do analiz z wykorzystaniem elektroforezy A-PAGE.

Elektroforeza

Analizy elektroforetyczne w systemie A-PAGE wykonywano zgodnie ze standardową procedurą opracowaną przez Bushuka i Zillmana (1978). Drobne modyfikacje pozwalające dostosować metodykę rozdziału do warunków laboratoryjnych ZRZb IHAR opisano we wcześniejszych pracach (Waga, 2000; Waga i Węgrzyn, 2000). Analizowano połówki ziarniaków F₂ uzyskane z kombinacji KBH 499 × Nepal 1. Białka ekstrahowano z bielma natomiast zarodki pozostawiano w rezerwie. Takie podejście umożliwia wykonanie analizy elektroforetycznej bez utraty cennych genotypów zawierających nietypowe kombinacje białek, co pozwala na ich rozmnożenie z przeznaczeniem do innych badań.

Interpretacja obrazów elektroforetycznych

Prążki elektroforetyczne charakterystyczne dla komponentów rodzicielskich: linii Nepal 1 oraz KBH 499 oznaczono odpowiednio skrótami „Nep” oraz „Sp”, i numerowano cyframi arabskimi zgodnie z rosnącą prędkością migracji białka w żelu (wartość „1” przyjęto dla prążków migrujących najwolniej). Analizując częstotliwość mieszańców zawierających określone grupy prążków używano także skrótów „Nep” oraz „Sp” w połączeniu z kolejnymi numerami rozpatrywanych frakcji.

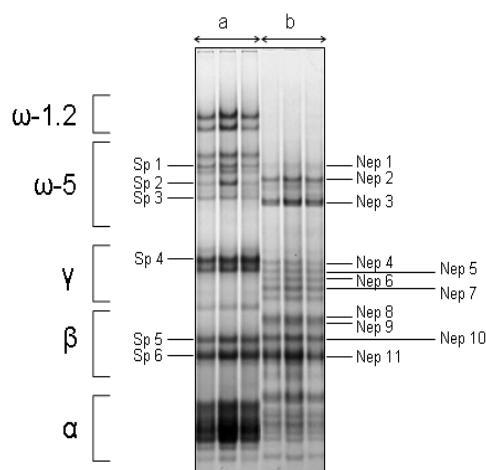
Identyfikacja bloków białek gliadynowych

Obrazy elektroforetyczne mieszańców klasyfikowano przyjmując jako kryterium podziału obecność lub brak określonych prążków elektroforetycznych, dla których założono, iż mogą stanowić jeden blok białkowy. Analizowane genotypy dzielono na grupy osobników homozygotycznych, w których rozpatrywane kombinacje prążków były identyczne jak w liniach Nepal 1 lub KBH 499, oraz osobników heterozygotycznych łączących — zgodnie z teorią dziedziczenia białek zapasowych — prążki obu komponentów rodzicielskich (Sobko i in., 1986). Zgodność obserwowanych liczebności w trzech grupach mieszańców z teoretycznie zakładanym stosunkiem rozszczepień 1:2:1 dla dwóch alleli jednego genu oszacowano na podstawie testu χ^2 . Analizując dwa geny zlokalizowane na różnych chromosomach, reprezentowane przez cztery alleliczne warianty białkowe, założono teoretyczny stosunek rozszczepień 1:2:1:2:4:2:1:2:1 dla modelu dziedziczenia niezależnego.

Celem zilustrowania nowych frakcji białkowych na tle uprzednio skatalogowanych bloków obliczano współczynniki R_m zgodnie z zasadą przedstawioną we wcześniejszej pracy (Waga, 2000). Wzorcem dla identyfikacji nowych bloków był prążek odniesienia znajdujący się w centralnej strefie obrazu elektroforetycznego każdego genotypu pszenicy, z którym porównywano prążki będące przedmiotem badań, mierząc odległość od punktu startowego elektroforezy do miejsca ich lokalizacji. Nowe bloki zidentyfikowane na podstawie analizy rozszczepienia genów i opisane na podstawie względnej prędkości migracji, wprowadzono do katalogu opracowanego w ZRZb IHAR (Waga, 2007).

WYNIKI I DYSKUSJA

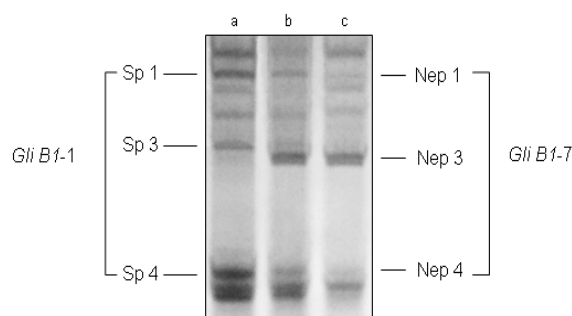
Komponenty rodzicielskie użyte do krzyżowań zawierały specyficzne frakcje białkowe, których nie obserwowano w trakcie dotychczasowych badań nad polimorfizmem gliadyn (rys. 1 b). Na szczególną uwagę zasługuje prążek Nep 3 w linii Nepal 1, który sądząc na podstawie jego lokalizacji w strefie ω -5 obrazu elektroforetycznego może być warunkowany chromosomem 1B. W drugiej formie rodzicielskiej linii — KBH 499 — chromosom 1B kontroluje blok *Gli B1-1* (prążki Sp 1, 3 i 4), szeroko rozpowszechniony wśród polskich odmian i rodów pszenicy. Interesujące kombinacje prążków obserwowano także w strefie β obu rodziców, w której nakładają się białka różnych chromosomów, głównie 6B i 6D. W tej części obrazu linia Nepal 1 zawiera cztery prążki: Nep 8, 9, 10 i 11, natomiast linia KBH 499 dwa prążki: Sp 5 i 6 zajmujące identyczną pozycję z Nep 10 i 11. Prążki Nep 8 i 9 pozwalają jednoznacznie odróżnić linię KBH 499 od Nepal 1 — linia KBH 499 w analogicznej strefie obrazu tworzy pustą przestrzeń co znacznie ułatwia obserwację prążków Nep 8 i 9 w potomstwie F₂. Charakterystyczną cechą linii Nepal 1 jest także brak kilku prążków w strefie ω -1.2, w której zazwyczaj występują białka kontrolowane chromosomem 1D. Świadczy to o obecności null allele'a w *locus Gli D1*. Linia KBH 499 w analogicznej strefie obrazu zawiera blok *Gli D1-1.2*.



Rys. 1 b. Białka gliadynowe form rodzicielskich. a. linia KBH 499. b. linia Nepal 1. Obraz elektroforetyczny uzyskany metodą A-PAGE. Wybrane frakcje gliadyn, będące przedmiotem badań, zaznaczono i opisano symbolami: „Sp” (białka linii KBH 499) oraz „Nep” (białka linii Nepal 1). Podział na grupy: α , β , γ , ω -5 i ω -1.2 różniące się prędkością migracji w żelu zaznaczono z lewej strony elektroforegramu

Fig. 1 b. Gliadin proteins of parental forms separated by A-PAGE. a. line KBH 499. b. line Nepal 1. Gliadin fractions scrutinized in this work were marked and described by the symbols: „Sp” (proteins of the line KBH 499) and „Nep” (proteins of the line Nepal 1). Distribution of gliadins differentiated in regard of electrophoretic mobility (α , β , γ , ω -5 and ω -1.2) are shown on the left hand side of the electrophoregram

Analizując badaną populację mieszańców F₂ pod względem liczebności osobników zawierających frakcję Nep 3 przyjęto, iż jest ona kontrolowana allelicznym wariantem genu frakcji Sp 3 i stanowi jeden z elementów bloku *Gli B1-1*. Mieszańce podzielono na trzy grupy osobników: zawierających prążek Nep 3 (homozygoty typu Nepal 1), zawierających prążek Sp3 (homozygoty typu KBH 499) oraz łączących prążki Nep 3 i Sp 3 w jednym genotypie (heterozygoty) (rys. 2).



Rys. 2. Obrazy elektroforetyczne frakcji ω -5 białek gliadynowych u mieszańców F₂ pochodzących z kombinacji krzyżowań linii Nepal 1 (Nep) i KBH 499 (Sp)

a. homozygota typu KBH 499; b. heterozygota; c. homozygota typu Nepal 1. Prążki zaznaczone po lewej i prawej stronie elektroforegramu tworzą bloki białek gliadynowych *Gli B1-1* oraz *Gli B1-7*.

Fig. 2. Electrophoregrams of ω -5 gliadin protein fractions observed in F₂ hybrid genotypes coming from cross combination between lines Nepal 1 and KBH 499

a. homozygote of type KBH 499 (Sp 1, 2 and 3). b. heterozygote. c. homozygote of type Nepal 1 (Nep 1, 2 and 3). Protein bands marked on the left and right side of the electrophoregrams are components of the gliadin blocks *Gli B1-1* and *Gli B1-7*, respectively

Na podstawie testu χ^2 stwierdzono zgodność obserwowanych liczebności w utworzonych grupach mieszańców z teoretycznie oczekiwanym stosunkiem 1:2:1 co potwierdza hipotezę, że frakcje Nep 3 i Sp 3 są warunkowane dwoma allelami jednego genu w *locus Gli B1* (tab. 1).

Ponadto stwierdzono, iż wszystkie osobniki zawierające Nep 3 występują w połączeniu z prążkiem Nep 1. Prążek Nep 1 zajmuje identyczną pozycję z Sp 1 (kolejnym składnikiem bloku *Gli B1-1*), jednak różni się od niego znacznie słabszym wybarwieniem, co świadczy o mniejszej zawartości białka Nep 1 w linii Nepal 1. Różnice intensywności wybarwienia obu prążków umożliwiają ich jednoznaczną identyfikację w genotypach homozygotycznych typu Nepal 1 i KBH 499. W heterozygotach obserwowano natomiast prążek o intensywności pośredniej między Nep 1 i Sp 1. Przytoczone fakty dowodzą, iż Nep 1 oraz Nep 3 stanowią (podobnie jak Sp 1 i Sp 3) jeden blok białkowy kontrolowany chromosomem 1B, któremu nadano symbol *Gli B1-7*. Dodatkowym elementem tego bloku jest prążek Nep 4, jeden z dwóch centralnie zlokalizowanych prążków, obecnych w większości bloków z grupy chromosomu 1B. Zazwyczaj są one mocno wybarwione, jednakże w linii Nepal 1 intensywność prążka Nep 4 jest znacznie mniejsza niż w innych genotypach, co stanowi kolejną, specyficzną cechę bloku *Gli B1-7*.

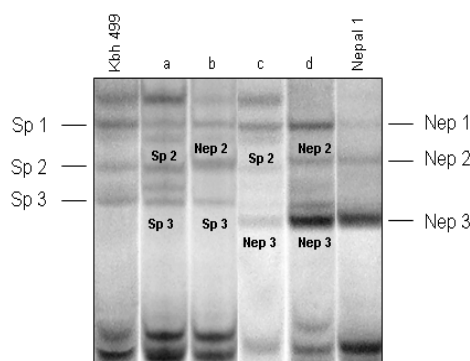
Tabela 1

Test zgodności (χ^2) dla mieszańców zróżnicowanych pod względem gliadyn Nep 3 i Sp 3, z teoretycznie zakładanym stosunkiem rozszczepień jednej pary alleli gliadynowych

Conformance test (χ^2) for hybrid genotypes, differentiated in regard of Nep 3 and Sp 3 protein fractions, with theoretically assumed segregation for one pair of gliadin alleles

Gliadyny Gliadins	Rozszczepienie Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
Nep 3	1	50	46	0,320	
Nep 3 + Sp 3	2	100	111	1,210	0,20–0,30
Sp 3	1	50	43	0,980	
		200	200	2,510	

W strefie ω -5 pojawia się także prążek Nep 2 zlokalizowany pomiędzy Nep 1 i Nep 3. Jego pozycja jest zbliżona do frakcji Sp 2 linii KBH 499. Jednak prędkość migracji Sp 2 jest nieznacznie większa od Nep 2. Taki sposób lokalizacji prążków u form rodzicielskich utrudnia ich obserwację w potomstwie mieszańcowym, a tym samym analizę genetyczną. Niemniej, w badanej populacji udało się zidentyfikować mieszańce, w których Nep 3 występuje łącznie z Sp 2, natomiast Nep 2 z Sp 3 (rys. 3). Obserwowane rekombinanty dowodzą, że Nep 2 i Nep 3 nie tworzą jednego bloku białkowego, lecz są kontrolowane genami, które ulegają rozszczepieniu się w F_2 . Jednak specyficzna lokalizacja obu prążków uniemożliwia stwierdzenie niezależnego dziedziczenia genów kodujących obie frakcje białkowe. Potwierdzenie lub odrzucenie takiej hipotezy wymaga dodatkowych badań z wykorzystaniem innego zestawu komponentów rodzicielskich.

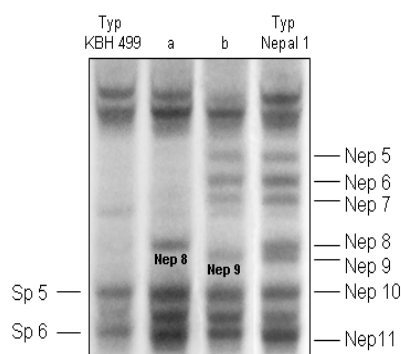


Rys. 3. Obrazy elektroforetyczne frakcji ω -5 białek gliadynowych u mieszańców F_2 pochodzących z kombinacji krzyżowań linii Nepal 1 (Nep) i KBH 499 (Sp). Rozdziały „b” i „c” ilustrują rekombinację genów kontrolujących frakcje Sp 2 i Sp 3 (typ KBH 499) oraz Nep 2 i Nep 3 (typ Nepal 1)

Fig. 3. Electrophoregrams of ω -5 gliadin protein fractions observed in F_2 hybrid genotypes coming from cross combination between lines Nepal 1 and KBH 499. Lines „b” and „c” show protein patterns of recombinant genotypes containing genes coding for Nep2/Sp3 and Sp2/Nep3 gliadin fractions

Identyfikacja β -gliadyn stanowi bardziej złożony problem w porównaniu z identyfikacją w pozostałych grupach białek gliadynowych. W strefie β występuje szereg

nakładających się prążków o zbliżonej bądź identycznej prędkości migracji, co znacznie utrudnia analizę genetyczną. Są one kontrolowane różnymi chromosomami, głównie 6B i 6D. W opisywanych badaniach problem ten został częściowo rozwiązany poprzez dobór odpowiednio zróżnicowanych komponentów rodzicielskich, z których jeden (Nepal 1) zawiera między innymi prążki Nep 8 i Nep 9, natomiast drugi (linia KBH 499) tworzy pustą przestrzeń w analogicznej pozycji na obrazie elektroforetycznym. Specyfika zróżnicowania obu rodziców pozwala jednoznacznie stwierdzić, że Nep 8 i 9 są kontrolowane genami, które ulegają rozszczepieniu w pokoleniu F₂. Dowodzi tego obecność mieszańców, z których jedne zawierają prążek Nep 8, a inne Nep 9 (rys. 4).



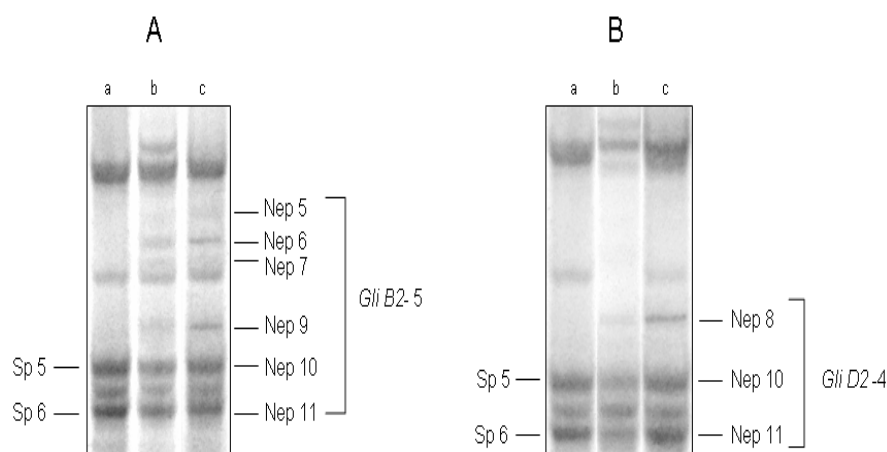
Rys. 4. Obrazy elektroforetyczne frakcji β i γ białek gliadynowych u mieszańców F₂ pochodzących z kombinacji krzyżowań linii Nepal 1 (Nep) i KBH 499 (Sp). Rozdziały „a” i „b” pokazują rozszczepienie genów kontrolujących frakcje Nep 8 i Nep 9

Fig. 4. Electrophoregrams of β - and γ -gliadin protein fractions observed in F₂ hybrid genotypes coming from cross combination between lines Nepal 1 and KBH 499. Lines „a” and „b” show segregation of genes coding for Nep 8 and Nep 9 protein fractions

Przyjęto założenie, iż grupy prążków Nep 5, 6, 7, 9, 10 i 11 oraz Sp 5 i 6 są kontrolowane allelicznymi wariantami genu na chromosomie 6B. Zakładając taką hipotezę wzorowano się na katalogu Metakowskiego, zgodnie z którym prążki w strefie γ -gliadyn (w tym przypadku Nep 5, 6 i 7) są komponentami bloków z grupy chromosomu 6B. Wśród badanych mieszańców obserwowano osobniki zawierające kombinacje identyczne jak u rodziców, co pozwala uznać je za homozygoty. Obserwowano też osobniki, w których prążki Nep 5, 6, 7 i 9 były znacznie słabiej wybarwione niż w homozygotach, i w związku z tym zostały zakwalifikowane jako heterozygoty (rys. 5 A). Analiza liczebności opisanych mieszańców wykazała zgodność z teoretycznym stosunkiem 1:2:1 co potwierdza, iż grupa prążków Nep 5, 6, 7, 9, 10 i 11 tworzy blok białkowy, któremu nadano symbol *Gli B2-5* (tab. 2).

W drugim przypadku założono, iż prążek Nep 8 wspólnie z Nep 10 i 11 tworzą blok warunkowany chromosomem 6D. W pokoleniu F₂ obserwowano trzy grupy mieszańców

zawierających: (1) intensywnie wybarwiony prążek Nep 8, (2) słabo wybarwiony prążek Nep 8 oraz (3) pustą przestrzeń w strefie zajmowanej przez Nep 8 (rys. 5 B). Wszystkie formy mieszańcowe zawierające Nep 8 występowały łącznie z Sp 5 i 6 (analogi Nep 10 i 11). Przyjęto, iż pierwsze dwie klasy odpowiadają typowi homozygoty zaś trzecia stanowi heterozygotę. Na podstawie testu χ^2 wykazano zgodność obserwowanych liczebności w trzech grupach mieszańców z teoretycznym stosunkiem 1:2:1 co dowodzi, że prążki Nep 8, 10 i 11 tworzą blok białkowy kontrolowany chromosomem 6D, któremu nadano symbol *Gli D2-4* (tab. 3).



Rys. 5. Obrazy elektroforetyczne frakcji β i γ -gliadyn u mieszańców F_2 pochodzących z kombinacji krzyżowań linii Nepal 1 (Nep) i KBH 499 (Sp). a. homozygota typu KBH 499; b. heterozygota; c. homozygota typu Nepal 1. A. Prążki zaznaczone po prawej stronie elektroforegramu tworzą blok *Gli B2-5*. B. Prążki zaznaczone po prawej stronie elektroforegramu tworzą blok *Gli D2-4*
Fig. 5. Electrophoregrams of β - and γ -gliadin protein fractions observed in F_2 hybrid genotypes coming from cross combination between lines Nepal 1 and KBH 499. a. homozygote of type KBH 499 (Sp 1, 2 and 3). b. heterozygote. c. homozygote of type Nepal 1 (Nep 1, 2 and 3). A. Protein bands marked on the right side of the electrophoregrams are components of the gliadin block *Gli B2-5*. B. Protein bands marked on the right side of the electrophoregrams are components of the gliadin block *Gli D2-4*

Tabela 2

Test zgodności (χ^2) dla mieszańców zróżnicowanych pod względem gliadyn Nep 5,6,7,9,10,11 i Sp 5,6 z teoretycznie zakładanym stosunkiem rozszczepień jednej pary alleli gliadynowych
Conformance test (χ^2) for hybrid genotypes, differentiated in regard of Nep 5,6,7,9,10,11 and Sp 5,6 protein fractions, with theoretically assumed segregation for one pair of gliadin alleles

Gliadyny Gliadins	Rozszczepienie Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
Nep 5,6,7,9,10,11	1	64	59	0,391	0,5-0,9
Nep 5,6,7,9,10,11 + Sp 5,6	2	128	132	0,125	
Sp 5,6	1	64	65	0,016	
		256	256	0,532	

Tabela 3

Test zgodności (χ^2) dla mieszańców zróżnicowanych pod względem gliadyn Nep 8,10,11 i Sp 5,6 z teoretycznie zakładanym stosunkiem rozszczepień jednej pary alleli gliadynowych
Conformance test (χ^2) for hybrid genotypes, differentiated in regard of Nep 8,10,11 and Sp 5,6 protein fractions, with theoretically assumed segregation for one pair of gliadin alleles

Gliadyny Gliadins	Rozszczepienie Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
Nep 8,10,11	1	64	59	0,391	0,3 - 0,5
Nep 8,10,11 + Sp 5,6	2	128	139	0,945	
Sp 5,6	1	64	58	0,563	
		256	256	0,532	

Identyfikacja rekombinantów, w których prążki Nep 7 i 8 występują oddzielnie, dała podstawę do wykonania analizy potwierdzającej, że bloki zidentyfikowane w strefie β są kontrolowane genami na różnych chromosomach i dziedziczą się niezależnie. W tym celu populację mieszańców podzielono na 9 klas oczekując, iż liczebności w tych klasach będą zgodne z teoretycznym stosunkiem rozszczepień 1:2:1:2:4:2:1:2:1 dla dwóch *loci*: *Gli B2* oraz *Gli D2* (tab. 4). Wynik testu χ^2 potwierdził hipotezę o niezależnym dziedziczeniu obu genów.

Tabela 4

Test zgodności (χ^2) dla mieszańców zróżnicowanych pod względem gliadyn Nep 5,6,7,9,10,11, Nep 8,10,11 i Sp 5,6 z teoretycznie zakładanym stosunkiem rozszczepień dla dwóch par alleli gliadynowych
Conformance test (χ^2) for hybrid genotypes, differentiated in regard of Nep 5,6,7,9,10,11, Nep 8,10,11 and Sp 5,6 protein fractions, with theoretically assumed segregation for two pairs of gliadin alleles

Locus Gli B2	Locus Gli B1	Rozszczepienie Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
Nep 5,6,7,9,10,11	Nep 8,10,11	1	16	13	0,563	0,3–0,5
Nep 5,6,7,9,10,11	Nep 8,10,11 + Sp 5,6	2	32	34	0,125	
Nep 5,6,7,9,10,11	Sp 5,6	1	16	12	1,000	
Nep 5,6,7,9,10,11 + Sp 5,6	Nep 8,10,11	2	32	28	0,500	
Nep 5,6,7,9,10,11 + Sp 5,6	Nep 8,10,11 + Sp 5,6	4	64	70	1,000	
Nep 5,6,7,9,10,11 + Sp 5,6	Sp 5,6	2	32	34	0,125	
Sp 5,6	Nep 8,10,11	1	16	18	0,250	
Sp 5,6	Nep 8,10,11 + Sp 5,6	2	32	35	0,281	
Sp 5,6	Sp 5,6	1	16	12	1,000	
			256	256	4,844	

Locus na chromosomie 1D w linii Nepal 1 tworzy null allel czyli gen, którego ekspresja została zablokowana — prawdopodobnie — w wyniku mutacji punktowej zmieniającej kodon glutaminy (CAA lub CAG) w stop kodon (UAA lub UAG) (Anderson i in., 2009). Mimo fizycznej obecności na chromosomie zablokowany gen nie ulega ekspresji uniemożliwiając syntezę białek. Efektem fenotypowym null alleli są puste obszary na obrazie elektroforetycznym w strefach odpowiadających *locus*, w którym wystąpiła mutacja. Wśród badanych mieszańców obserwowano genotypy zawierające: null allel na chromosomie 1D, blok *Gli D1-1.2* (homozygoty) oraz formy wykazujące pośrednią

intensywność prążków odpowiadające genotypowi heterozygoty (*Gli DI-1.2* + null) (rys. 6 A). Jednakże w wykonanym doświadczeniu częstotliwości obserwowane dla poszczególnych wariantów znacznie odbiegały od stosunku 1:2:1 przy niemal dwukrotnie większej liczbie homozygot typu *Gli DI-1.2* niż heterozygot i null alleli łącznie (tab. 5).

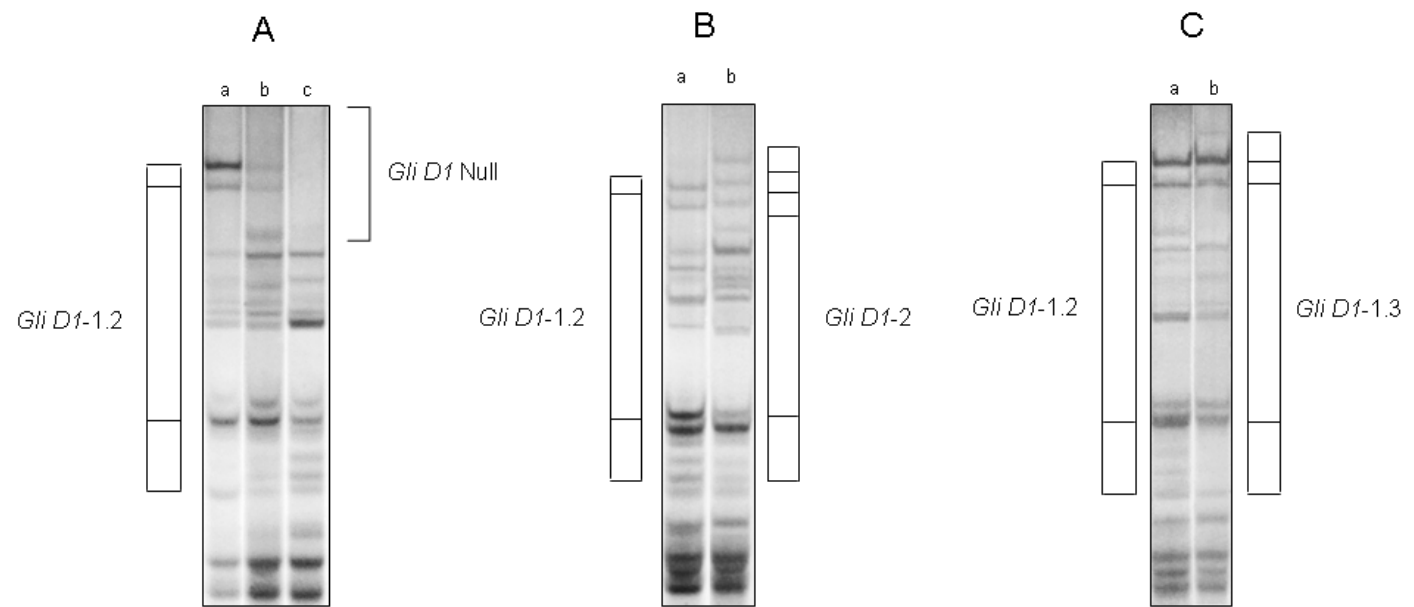
Tabela 5

Procentowy udział genotypów mieszańcowych zróżnicowanych pod względem gliadyn warunkowanych chromosomem 1D
Contribution of genotypes differentiated in regard of gliadin proteins coded by the chromosome 1D in analyzed hybrid population

<i>Locus</i> Gli D1	Procent populacji Percentage of population
<i>Gli DI-1.2</i>	60,51
<i>Gli DI-1.2</i> + <i>Gli DI</i> -null	16,30
<i>Gli DI</i> - null	15,58
<i>Gli DI</i> -1.3	5,80
<i>Gli DI</i> -2	1,81
	100

Na podstawie uzyskanych wyników trudno byłoby jednoznacznie stwierdzić, jakie są przyczyny tak znacznego odstępstwa od mendlowskiego stosunku rozszczepień. Teoretycznie można przyjąć hipotezę, iż w badaniach obserwowano funkcjonowanie mechanizmu naprawczego, który znosi efekt mutacji i wtórnie przekształca „stop kodon” w kodon właściwy dla glutaminy, dzięki czemu następuje odblokowanie biosyntezy białek. Podobny przypadek został opisany w pracy innych autorów (Hsia i Anderson, 2001). Za słuszością przedstawionej hipotezy przemawia też znacznie podwyższona częstotliwość homozygot zawierających wariant kodujący czyli blok *Gli DI-1.2*. Inną przyczyną obserwowanego zjawiska mogą być daleko posunięte zmiany w budowie genu (być może nawet chromosomu), których efektem są zaburzenia mejozy i — w konsekwencji — stwierdzone odstępstwa od teoretycznego stosunku rozszczepień.

Wśród mieszańców pojawiały się także białka niespecyficzne dla użytych komponentów rodzicielskich. Były to: blok *Gli DI-2* (rys. 6 B) oraz nowa kombinacja białek, w której frakcje ω -1.2 charakterystyczne dla bloku *Gli DI-1* występowały łącznie z frakcją γ typową dla bloku *Gli DI-1.2* (rys. 6 C). Obserwowane układy białek są prawdopodobnie efektem rekombinacji wewnątrzgenowej. Jej pojawienia się można oczekiwać wśród materiałów hodowlanych, dlatego nową kombinację prążków w grupie chromosomu 1D wprowadzono do katalogu i oznaczono symbolem *Gli DI-1.3*. Wymienione, niespecyficzne bloki występowały w pojedynczych przypadkach co mogłoby sugerować, iż stanowią one domieszkę obcych materiałów. Taką możliwość wyklucza jednak specyfika pozostałych fragmentów elektroforegramu, w których obserwowane frakcje gliadyn były typowe dla form rodzicielskich.



Rys. 6. Obrazy elektroforetyczne białek gliadynowych u mieszańców F₂ pochodzących z kombinacji krzyżowań linii Nepal 1 (Nep) i KBH 499 (Sp). A. Zróźnicowanie białek kontrolowanych chromosomem 1D. a. homozygota *Gli D1* -1.2; b. heterozygota (*Gli D1* -1.2 + *Gli D1* -null); c. homozygota *Gli D1* -null. B i C. Porównanie ω-gliadyn. a. blok *Gli D1* -1.2 (linia KBH 499); b. niespecyficzne dla użytych komponentów rodzicielskich bloki *Gli D1* -2 (B) oraz *Gli D1* -1.3 (C)

Fig. 6. Electrophoregrams of gliadin proteins observed in F₂ hybrid genotypes coming from cross combination between lines Nepal 1 and KBH 499. A. differentiation of proteins coded by the locus on the chromosome 1D. a. homozygote *Gli D1* -1.2; b. heterozygote (*Gli D1* -1.2 + *Gli D1* -null); c. homozygote *Gli D1* -null. B and C. Comparison of ω-gliadins. a. gliadin block *Gli D1*-1.2 (line KBH 499). b. gliadin blocks *Gli D1*-2 (B) and *Gli D1* -1.3 (C) do not appear in any of the parental lines

Wszystkie prążki w obrębie nowych bloków scharakteryzowano na podstawie wskaźnika R_m , który informuje o względnej prędkości migracji badanych białek w stosunku do prążka stanowiącego punkt odniesienia (tab. 6). Znajduje się on w centralnej strefie obrazu i jest składnikiem bloków kontrolowanych chromosomem 1D. U większości form pszenicy heksapoloidalnej występuje w identycznej pozycji co znacznie ułatwia określenie lokalizacji innych prążków na schematach graficznych. W przyjętej metodzie obliczania R_m frakcje znajdujące się powyżej punktu odniesienia przyjmują wartości mniejsze, zaś poniżej — wartości większe od jedności co oznacza, że wartość wskaźnika R_m rośnie proporcjonalnie wraz ze wzrostem prędkości migracji białek.

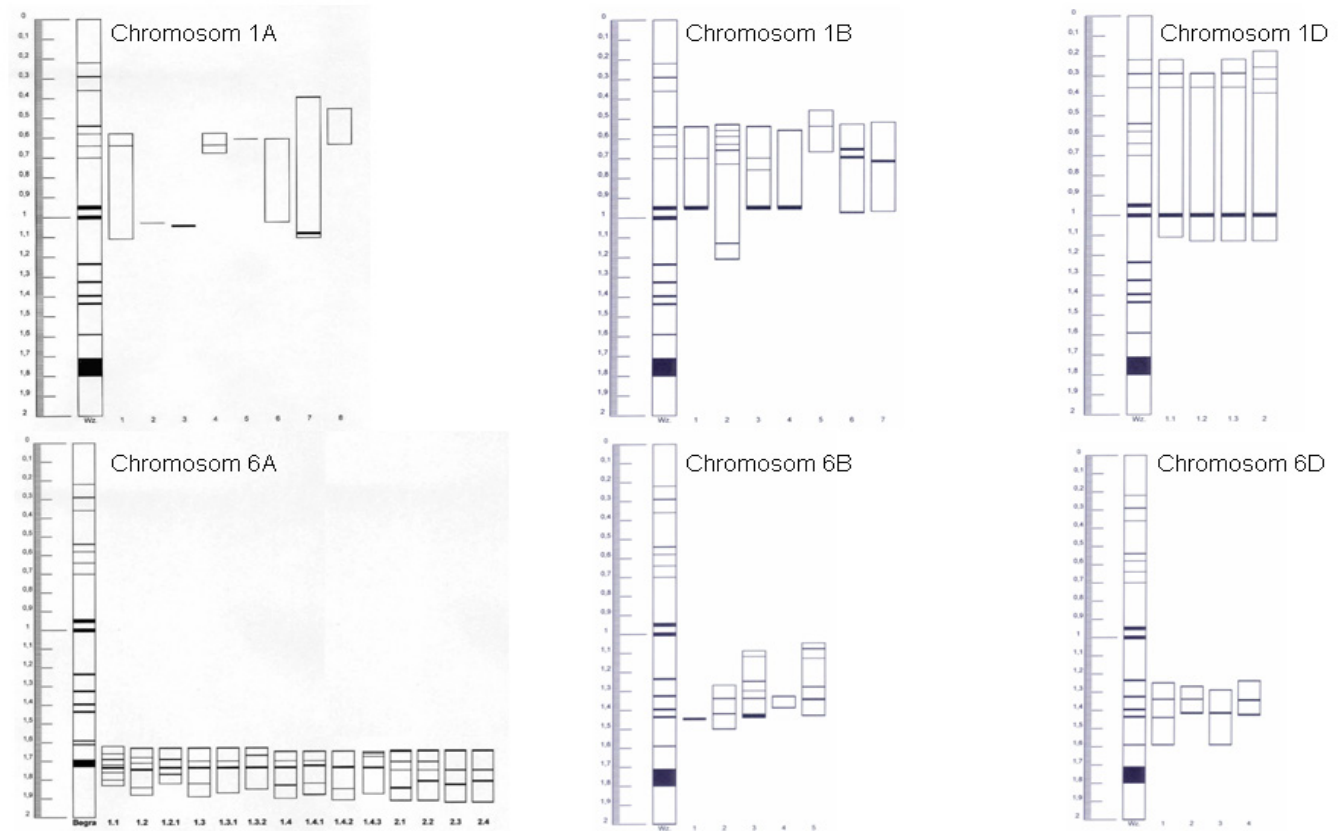
Tabela 6

Charakterystyka zidentyfikowanych bloków białek gliadynowych na podstawie współczynnika względnej prędkości elektroforetycznej frakcji (R_m)
Characteristics of gliadin blocks based on relative electrophoretic mobilities of analyzed protein bands (R_m)

<i>Locus</i>	Numer bloku gliadyn Number of gliadin block	Symbol prążka Symbol of the band	R_m
<i>Gli B1</i>	7	Nep 1	0,52
<i>Gli B1</i>	7	Nep 3	0,72
<i>Gli B1</i>	7	Nep 4	0,97
<i>Gli B2</i>	5	Nep 5	1,05
<i>Gli B2</i>	5	Nep 6	1,08
<i>Gli B2</i>	5	Nep 7	1,13
<i>Gli B2</i>	5	Nep 9	1,28
<i>Gli B2</i>	5	Nep 10	1,35
<i>Gli B2</i>	5	Nep 11	1,43
<i>Gli D2</i>	4	Nep 8	1,24
<i>Gli D2</i>	4	Nep 10	1,35
<i>Gli D2</i>	4	Nep 11	1,43

Nowe bloki, zidentyfikowane w trakcie opisanych badań wprowadzono do katalogu, zwiększając tym samym zakres zmienności alleli gliadynowych w loci *Gli B1*, *Gli D1*, *Gli B2* oraz *Gli D2* (rys. 7). Frakcje wchodzące w skład nowych bloków są nietypowe dla odmian i rodów pszenicy badanych w Polsce, a nawet w Europie. Na szczególną uwagę zasługuje blok *Gli B1-7*, którego budowa znacznie odbiega od innych wariantów białkowych w grupie chromosomu 1B. Stanowi to cechę korzystną, ułatwiającą jego identyfikację wśród materiałów hodowlanych. Unikalny charakter *Gli B1-7* dodatkowo potwierdza fakt, iż nie znalazł się on w katalogu Metakowskiego, który stanowi — obecnie — najliczniejszy zbiór bloków opisanych na podstawie analizy genetycznej (Metakovsky, 1991 a).

Charakterystyka nowych kombinacji białek gliadynowych jest pierwszym etapem badań nad określeniem ich związku ze zmiennością cech użytkowych — głównie cech jakości technologicznej odmian i rodów pszenicy. Stwierdzenie takich zależności ma kluczowe znaczenie z punktu widzenia możliwości praktycznego zastosowania bloków gliadyn i decyduje o tym czy obraz elektroforetyczny będzie tylko miernikiem zmienności genetycznej w populacjach mieszańcowych, czy też będzie efektywnym markerem biochemicznym, ułatwiającym wybór korzystnych genotypów na wczesnych etapach hodowli.



Rys. 7. Katalog bloków białek gliadynowych. Nowe bloki opisane w pracy znajdują się w grupach chromosomów 1B (*Gli B1 -7*), 1D (*Gli D1 -1.3*, 6B (*Gli B2 -5*) oraz 6D (*Gli D2 -4*). Dla każdej rodziny bloków zaznaczono skalę wartości wskaźnika Rm obok schematu odmiany wzorcowej Begra

Fig. 7. Catalogue of gliadin protein blocks. Novel gliadin blocks described in the paper are placed in groups of chromosomes 1B (*Gli B1 -7*), 1D (*Gli D1 -1.3*, 6B (*Gli B2 -5*) and 6D (*Gli D2 -4*). Scale of relative mobility values (Rm) and the patterns of electrophoretic bands for cultivar Begra are referred to each family of the blocks

LITERATURA

- Anderson O. D., Gu Y. Q., Kong X., Lazo G. R., Wu J. 2009. The wheat ω -gliadin genes: structure and EST analysis. *Funct. Integr. Genomics* 9: 397 — 410.
- Bushuk W., Zillman R. R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can J. Plant Sci.* 58: 505 — 515.
- Hsia C. C., Anderson O. D. 2001. Isolation and characterization of wheat ω -gliadin genes. *Theor. Appl. Genet.* 103: 37 — 44.
- ICC (International Association for Cereal Science and Technology). 1995. Wheat — identification of varieties by electrophoresis. ICC Standard No.143. pp: 1 — 13.
- Metakovsky E. V. 1991 a. Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. & Breed.* 45: 325 — 344.
- Metakovsky E. V. 1991 b. The value of gliadin biotypes in commercial cultivars of wheat. Proc. 4th Int. Workshop on Gluten Proteins (Winnipeg, Canada, 1991) W. Bushuk and R. Tkachuk, Eds. AACC, St. Paul, Minnesota: 558 — 568.
- Metakovsky E. V., Gomez M., Vazquwz J. F., Carillo J. M. 2000. High genetic diversity of Spanish common wheats as judged from gliadin alleles. *Plant Breed.* 119: 37 — 42.
- Metakovsky E. V., Graybosch R. A. 2006. Gliadin alleles in wheat: Identification and applications. In: Gliadin and Glutenin — the unique balance of wheat quality. Wrigley C., Bekes F. and Bushuk W. Eds. AACC Int. St. Paul, Minnesota, USA: 85 — 114.
- Payne P. I., 1987, Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 141 — 152.
- Sobko T. A., Poperelya F. A., Rybalka A. I., Sozinov A. A. 1986. Inheritance and mapping of storage protein genes on the chromosome 1A of common wheat. *Tsitol. Genet.* 20: 372 — 376 (in Russian).
- 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.
- Waga J. 2007. Katalog bloków białek gliadynowych polskich odmian i rodów pszenicy zwyczajnej. *Biul. IHAR* 243: 3 — 23.
- Waga J., Węgrzyn S. 2000. Powiązanie wybranych frakcji białek gliadynowych ze zmiennością cech użytkowych odmian i rodów pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 215: 61 — 76.