

MONIKA LANGNER
BOLESŁAW P. SALMANOWICZ
Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Identyfikacja puroindolinowych alleli w krajowych odmianach pszenicy przy zastosowaniu markerów molekularnych

Identification of puroindoline alleles in Polish wheat cultivars by molecular markers

Twardość endospermu odgrywa ważną rolę w charakterystyce jakościowej ziarna pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) i ma znaczący wpływ na mielenie, wypiek i jakość końcową produktu. Zmienność genowej sekwencji oraz mutacje dwóch puroindolinowych genów (*Pina-D1* i *Pinb-D1*), zlokalizowanych w lokus *Ha* na chromosomie 5D, w większości wyjaśniają zakres zmienności tekstury pszenicznych ziarniaków. Celem przedstawionych badań było charakteryzowanie form allelicznych puroindolinowych genów w odmianach pszenicy zarejestrowanych w Polsce. Łącznie dla 69 odmian przeprowadzono pomiary SKCS twardości ziarna oraz zidentyfikowano obecność puroindolinowych alleli stosując markery molekularne. Na podstawie średnich wartości SKCS twardości, 8 odmian zakwalifikowano do twardego typu pszenic, 60 odmian do pośredniego oraz 1 odmianę do miękkiego. Wszystkie krajowe odmiany posiadały allel *Pina-D1a*. Do rozróżnienia alleli genu *Pinb-D1*, produkty PCR tego genu rozkładano na mniejsze fragmenty stosując enzym restrykcyjny *BsrBI*. Wśród badanych prób, 35 odmian posiadało allel dzikiego-typu *Pinb-D1a*.

Słowa kluczowe: enzym restrykcyjny, PCR, pszenica, puroindoliny, twardość ziarna, zmienność alleliczna

Endosperm hardness plays an important role in quality characteristics of cultivated wheat (*Triticum aestivum* L.) and has a significant effect on milling and baking processes and on the quality of the final product. Gene sequence variation and mutations to the two puroindoline genes (*Pina-D1* and *Pinb-D1*), located at the *Ha* locus on the chromosome 5D, account for the majority of variation in wheat kernel texture. The objective of the presented study was to characterize the allelic forms of puroindoline genes in Polish wheat cultivars. For a total of 69 wheat cultivars the measurement of SKCS grain hardness was performed, and puroindoline alleles were identified by molecular markers. On the basis of mean SKCS hardness eight cultivars were classified as a hard type, 60 cultivars as a mixed one and one as a soft type. In all the cultivars the *Pina-D1a* allele was identified. To identify alleles of *Pinb-D1* gene, PCR product of this gene was digested to small fragments by *BsrBI* restriction enzyme. Among the grain samples, 35 cultivars were found to possess the wild-type *Pinb-D1a* allele.

Key words: allelic variation, kernel hardness, PCR, puroindolines, restriction enzyme, wheat

WSTĘP

Tekstura endospermu tj. twardość lub miękkość ziarna jest ważną cechą determinującą szereg własności technologicznych, mającą bezpośredni wpływ na wartość przemiałową, wartość wypiekową (wodochłonność, test sedymentacyjny, objętość chleba w próbnym wypieku) oraz końcową jakość produktu. Mąka z twardego ziarna pszenicy nadaje się do wypieku chleba, natomiast ziarna miękkie bardziej do wypieku ciast i ciastek (Morris i Rose, 1996).

Twardość ziarna pszenicy w znacznym stopniu determinowana jest kompleksem białek friablinowych. W skład frakcji friablinowej wchodzi głównie puroindoliny oraz białka *GSP-1*. Geny kodujące tę klasę białek są silnie sprzężone i występują w genomie D pszenicy. Twardość ziarna jest w znacznym stopniu kontrolowana przez gen *Ha* (Hardness) zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 5D (gen dominujący *Ha* determinuje ziarno miękkie, a allel recesywny ziarno twarde) (Law i in., 1978; Giroux i Morris, 1997, 1998). Obecność tego genu nie tłumaczy jednak całego spektrum zmienności obserwowanej w twardości ziarna (Sourdille i in., 1996; Perretant i in., 2000). Geny trzech polipeptydów (puroindoliny-a, puroindoliny-b i białka *GSP-1*) zostały zidentyfikowane jako ściśle związane z genem *Ha* (Gazza i in., 2005). Geny zlokalizowane na chromosomach 5DS (*Pina-D1* i *Pinb-D1*) kodujące białka puroindolinowe są ogólnie uznawane jako markery genetyczne tekstury endospermu ziarna pszenicy (Swan i in., 2006). Dotychczas zidentyfikowano dziewięć alleli genu *Pina-D1*: *Pina-D1a* – kodujący dziki-typ, *Pina-D1b* – nullowa forma (twarde ziarno) i *Pina-D1c-h, o* (Giroux i Morris, 1997; Massa i in., 2004; Chen i in., 2006). W locus *Pinb-D1* wyróżnia się obecnie 17 alleli różniących się między sobą pojedynczymi nukleotydowymi mutacjami (Lillemo i Morris, 2000; Morris i in., 2001; Chang i in., 2006; Chen i in., 2007; Li i in., 2007; Wang i in., 2008). Bielmo miękkie występuje wtedy kiedy w obydwu genach znajdują się allele dominujące (*Pina-D1a*, *Pinb-D1a*), natomiast bielmo twarde jest efektem mutacji jednego lub obydwu genów.

Głównym celem pracy była identyfikacja form allelicznych genów *Pina* i *Pinb* kodujących białka puroindolinowe odpowiedzialne za twardość ziarna w krajowych odmianach pszenicy przy zastosowaniu markerów molekularnych. Uzyskane dane porównano z wynikami oznaczonymi na podstawie pomiaru twardości ziarna techniką SKCS, celem oceny przydatności zastosowanych markerów molekularnych dla praktyki.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Badania objęły 69 odmian pszenicy zwyczajnej ozimej i jarej znajdujące się w Krajowym Rejestrze Odmian Roślin Uprawnych w roku 2007/2008 wyhodowanych w Hodowli Roślin Strzelce oraz 14 wzorcowych odmian pochodzących z Kanady, USA i Australii (AC Corine, Amazon, Bellevue, Benhur, Chinese Spring, Fortuna, Franklin, Galaxie, Glenavon, Glenlea, Norvin, Super X, Wildcat oraz Yecora Royo).

Pomiar twardości ziarna

Do pomiaru twardości ziarna zastosowano Perten Single Kernel Characterization System (SKCS) 4100 (firmy Perten Instruments AB, Huddinge, Sweden), postępując zgodnie z normą AACC Metod 55-31. Wskaźniki SKCS twardości uzyskiwano krusząc 300 oczyszczonych, niepołamanych ziarniaków dla każdej z badanych odmian. Na podstawie wyznaczonych wartości średnich dla 300 pomiarów (SKCS indeks) oraz wielkości odchyień standardowych przeprowadzono klasyfikację twardości ziarniaków poszczególnych odmian pszenicy do trzech klas: pszenic miękkich (średnia wartość SKCS <40), pośrednich (średnia wartość SKCS od 40 do 60) oraz twardych (SKCS >60). Dodatkowo na podstawie rozkładu danych dla pojedynczych ziarniaków wyróżniono cztery klasy twardości ziarniaków w następujących przedziałach ≤ 33 , 34-46, 47-59, ≥ 60 jednostek pomiarowych.

Ekstrakcja DNA i analizy PCR

Izolację genomowego DNA z tygodniowych siewek przeprowadzono wg zmodyfikowanej procedury Horn i Rafalski (1992). Na każdą próbę składało się pięć roślin. Ekstrakty były doprowadzane do stężenia 100 ng/ μ l i przechowywane w -20°C .

Amplifikacja DNA przebiegała w roztworze reakcyjnym (25 μ l) zawierającym: 1 \times bufor (Qiagen), 2mM MgCl_2 , 200mM każdego z dNTP, 0,2mM każdego ze starterów, 50 ng genomowego DNA oraz 0,5U HotStar Taq Polimerazy (Qiagen). Reakcje przeprowadzono w termocyklerze PTC200 (MJ Research, USA) w warunkach: 95°C 15 min; 35 cykli: 94°C 1 min, $48\text{--}58^{\circ}\text{C}$ 1 min (zgodnie z T_m starterów), 72°C 2,30 min; 72°C 10 min. Produkty PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy napięciu 80 V w buforze TBE i wizualizowano na transiluminatorze w świetle UV.

Produkty PCR wielkości 469 bp uzyskane w wyniku amplifikacji przy zastosowaniu pary starterów HD3 trawiono enzymem restrykcyjnym *BsrBI* (Dubcovsky i in., 1999). Inkubacja 30 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej enzym restrykcyjny *BsrBI*, 10x bufor Tango oraz mieszaninę PCR, przebiegała 3 godziny w temperaturze 37°C . Denaturację prowadzono w temperaturze 65°C przez 20 min. Strawione produkty frakcjonowano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy napięciu 80 V w buforze TBE i wizualizowano na transiluminatorze w świetle UV.

WYNIKI I DYSKUSJA

Rozkład SKCS twardości ziarna krajowych odmian pszenicy

Na podstawie SKCS indeksu twardości ziarna (wartość średnia dla 300 ziarniaków) 8 odmian pszenicy zostało zakwalifikowanych jako twarde, 60 jako pośrednie oraz jedna jako miękka (odmiana Rapsodia). Dla poszczególnych odmian SKCS indeks twardości wahał się od 14,34 (odm. Rapsodia) do 68,86 (odm. Brillant), przy czym dla większości krajowych odmian SKCS indeks wynosił od 40 do 50 jednostek. Kwalifikując odmiany w oparciu o rozkład danych dla poszczególnych ziarniaków do klasy pszenic twardych zaliczono 8 odmian, średnio-twardych 28 odmian, średnio-miękkich 30 odmian oraz miękkich — 3 odmiany (tab. 1). Lillemo i Morris (2000) badając m.in. 179 europejskich

odmian pszenic również wskazywali na niski udział odmian o typowo miękkich ziarniakach.

Tabela 1

Częstotliwość występowania klas SKCS twardości ziarna w krajowych odmianach pszenicy
Frequency distribution for SKCS grain hardness of Polish wheat cultivars

A

SKCS klasy twardości ziarna (wartość średnia)		
Mean SKCS grain hardness classes		
Miękkie (Soft)	Pośrednie (Mixed)	Twarde (Hard)
< 40	40 – 60	> 60
1 (1,5 %)	60 (86,9 %)	8 (11,6 %)

B

Klasy twardości wg rozkładu twardości pojedynczych ziarniaków			
Hardness classes according to distribution of individual grain hardness data			
Miękkie (Soft)	Średnio-miękkie (Mixed-soft)	Średnio-twarde (Mixed-hard)	Twarde (Hard)
≤ 33	34-46	47-59	≥ 60
3 (4,3 %)	30 (43,5 %)	28 (40,6 %)	8 (11,6 %)

Zmienność alleliczna genów *Pina-D1* i *Pinb-D1* w krajowych odmianach pszenicy

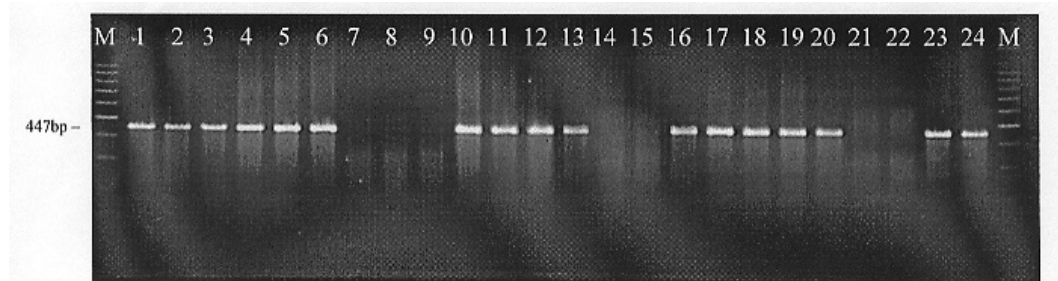
W prezentowanych badaniach zastosowano 9 zestawów starterów opracowanych na podstawie znajomości pojedynczych nukleotydowych mutacji sekwencji DNA kodujących białka puroindolinowe pszenicy (tab. 2) (Caparelli i in., 2003; Chang i in., 2006; Chen i in., 2006, 2007; Li i in., 2007).

Tabela 2

Zestawienie markerów molekularnych do identyfikacji puroindolinowych alleli pszenicy
List of markers for identification of puroindoline alleles in wheat cultivars

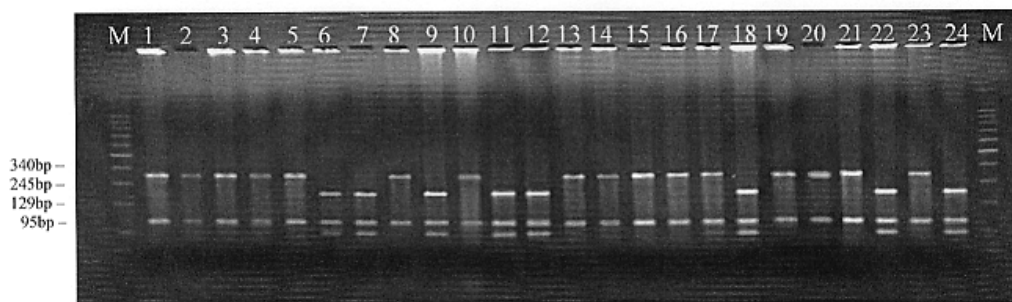
Nazwy starterów: Names of primers:	Sekwencje starterów (5'-3'): Forward and reverse primer sequences (5'-3'):	Allele/geny Alleles/genes	Wielkość produktów Product size of
HD1	5'- ATG AAG GCC CTC TTC CTC A - 3' 5'- TCA CCA GTA ATA GCC AAT AGT G - 3'	<i>Pina-D1a</i>	447 bp
HD2	5'- CAT CTA TTC ATC TCC ACC TGC - 3' 5'- GTG ACA GTT TAT TAG CTA GTC - 3'	<i>Pina-D1a</i>	524 bp
HD3	5'- ATG AAG ACC TTA TTC CTC CTA - 3' 5'- GGC ACG AAT AGA GGC TAT ATC A - 3'	<i>Pinb-D1</i>	469 bp
HD4	5'- TTG AAA ACA TGA AGA CCT TAT T - 3' 5'- GAG GAG GCT ATA TCA TCA CCA GTA A - 3'	<i>Pinb-D1</i>	524 bp
HD5	5'- GAG CCT CAA CCC ATC TAT TCA TC - 3' 5'- CAA GGG TGA TTT TAT TCA TAG - 3'	<i>Pinb-D1</i>	597 bp
HD6	5'- ATG AAG ACC TTA TTC CTC CTA - 3' 5'- CCT CAT GCT CAC AGC CGC C - 3'	<i>Pinb-D1a</i>	250 bp
HD7	5'- ATG AAG ACC TTA TTC CTC CTA - 3' 5'- CCT CAT GCT CAC AGC CGC T - 3'	<i>Pinb-D1b</i>	250 bp
HD8	5'- ATG AAG ACC TTA TTC CTC CTA - 3' 5'- CTC ATG CTC ACA GCC GCT - 3'	<i>Pinb-D1a</i>	223 bp
HD9	5'- ATG AAG ACC TTA TTC CTC CTA - 3' 5'- CTC ATG CTC ACA GCC GCC - 3'	<i>Pinb-D1b</i>	223 bp

Markery weryfikowano stosując wzorcowe odmiany zawierające poszczególne warianty genów *Pina-D1* i *Pinb-D1*. Dwa zestawy starterów HD1 i HD2 (tab. 2) posłużyły do identyfikacji odmian posiadających allel *Pina-D1a*, dając odpowiednio produkty amplifikacji o wielkości 447 bp i 524 bp (rys. 1).



Rys. 1. PCR produkt uzyskany przy zastosowaniu zestawu starterów HD1 charakterystyczny dla allelu *Pina-D1a*. Linie: M-100 bp DNA Ladder (Promega); 1- Alcazar, 2- Cytra, 3- Sława, 4- Sukces, 5- Figura, 6- Franklin, 7- Amazon, 8- Fortuna, 9- Yecora Royo, 10- Mewa, 11- Kobiera, 12- Henika, 13- Slade, 14- Wildcat, 15- Glenlea, 16- Sakwa, 17- Chinese Spring, 18- Rubens, 19- Radunia, 20- Tonacja, 21- Super X, 22- AC Corine, 23- Hewilla, 24- Koksa. Odmiany pszenicy zawierające allel *Pina-D1a* ujawniały fragment wielkości 447 bp

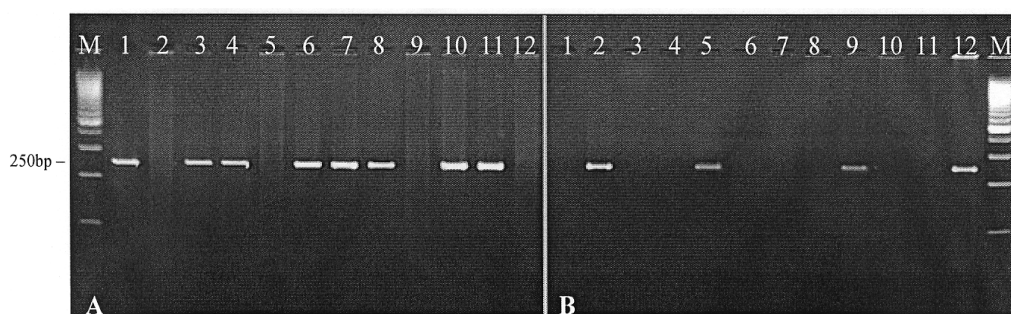
Fig. 1. PCR product of primer set HD1 specific for *Pina-D1a*. Lanes: M-100 bp DNA Ladder (Promega); 1- Alcazar, 2- Cytra, 3- Sława, 5- Figura, 6- Franklin, 7- Amazon, 8- Fortuna, 9- Yecora Royo, 10- Mewa, 11- Kobiera, 12- Henika, 13- Slade, 14- Wildcat, 15- Glenlea, 16- Sakwa, 17- Chinese Spring, 18- Rubens, 19- Radunia, 20- Tonacja, 21- Super X, 22- AC Corine, 23- Hewilla, 24- Koksa. Wheat cultivars containing *Pina-D1a* show a DNA



Rys. 2. Identyfikacja alleli *Pinb-D1a* i *Pinb-D1b* przy użyciu enzymu restrykcyjnego *BsrBI*. Linie: M-100 bp DNA Ladder (Promega); 1- Nutka, 2- Broma, 3- Hewilla, 4- Milvus, 5- Pasteur, 6- Muza, 7- Nawra, 8- Chinese Spring, 9- Franklin, 10- Jubilatka, 11- Batuta, 12- Brillant, 13- Bombona, 14- Rapsodia, 15- Zadra, 16- Galaxie, 17- Trend, 18- Dorota, 19- Bogatka, 20- Żura, 21- Tybalt, 22- Finezja, 23- Benhur, 24- Ludwig. *BsrBI* rozkłada produkt PCR (469 bp) na dwa fragmenty (340 bp, 129 bp) dla *Pinb-D1a* lub trzy fragmenty (245 bp, 129 bp i 95 bp) dla *Pinb-D1b*

Fig. 2. Identification of *Pinb-D1a* or *Pinb-D1b* using restriction enzyme *BsrBI*. Lanes: M-100 bp DNA Ladder (Promega); 1- Nutka, 2- Broma, 3- Hewilla, 4- Milvus, 5- Pasteur, 6- Muza, 7- Nawra, 8- Chinese Spring, 9- Franklin, 10- Jubilatka, 11- Batuta, 12- Brillant, 13- Bombona, 14- Rapsodia, 15- Zadra, 16- Galaxie, 17- Trend, 18- Dorota, 19- Bogatka, 20- Żura, 21- Tybalt, 22- Finezja, 23- Benhur, 24- Ludwig. *BsrBI* digests the PCR product (469 bp) to two fragments (340- and 129 bp) for *Pinb-D1a* or three fragments (245-, 129- and 95 bp products) for *Pinb-D1b* allele

Produktów PCR nie otrzymywano u odmian z formą nullową tego genu (allel *Pina-D1b*). Uzyskane dane potwierdzają informacje wcześniej przedstawione przez Lillemo i Morrissa (2000), którzy wśród 179 europejskich pszenic tylko u jednej odmiany stwierdzili obecność allelu *Pina-D1b*. Allel *Pina-D1b* zidentyfikowano natomiast u 8 odmian wzorcowych pochodzących z USA, Kanady i Australii (tab. 3). Warianty alleliczne genu *Pinb-D1* wykrywano stosując siedem par starterów (HD3-HD9) (tab. 2). Zestawy HD3-HD5 dawały kolejno produkty PCR wielkości 469 bp, 524 bp i 597 bp u wszystkich badanych odmian, potwierdzając obecność genu *Pinb-D1*, lecz nie rozróżniały jego form allelicznych. Do identyfikacji alleli tego genu zastosowano enzym restrykcyjny *BsrBI*. W wyniku analizy restrykcyjnej produktu PCR wielkości 469 bp otrzymano dwa profile prążkowe (rys. 2). Produkty wielkości 340 bp i 129 bp wyróżniały odmiany posiadające allel *Pinb-D1a*. Profil trzech prążków wielkości 245 bp, 129 bp oraz 95 bp wyróżniał odmiany z mutacją tego genu i charakteryzował pszenice z allelem *Pinb-D1b*, który występował u 31 badanych form (tab. 3). Wyniki analizy restrykcyjnej potwierdziły reakcje PCR z zastosowaniem kolejnych par starterów. Zestawy HD6 i HD7 różnicowały odmiany z allelami *Pinb-D1a* i *Pinb-D1b* amplifikując produkty wielkości 250 bp (rys. 3).



Rys. 3. Pary starterów HD6 i HD7 amplifikują charakterystyczny fragment PCR wielkości 250 bp odpowiednio dla alleli *Pinb-D1a* (A) i *Pinb-D1b* (B). Linie: M-100 bp DNA Ladder (Promega); 1- Parabola, 2- Franklin, 3- Nutka, 4- Zyta, 5- Mikula, 6- Clever, 7- Bryza, 8- Yecora Royo, 9- Almari, 10- Boomer, 11- Chinese Spring, 12- Ostka Strzelecka

Fig. 3. HD6 and HD7 primer pairs produce a characteristic PCR fragment of 250 bp for the alleles *Pinb-D1a* (A) and *Pinb-D1b* (B), respectively. Lanes: M-100 bp DNA Ladder (Promega); 1- Parabola, 2- Franklin, 3- Nutka, 4- Zyta, 5- Mikula, 6- Clever, 7- Bryza, 8- Yecora Royo, 9- Almari, 10- Boomer, 11- Chinese Spring, 12- Ostka Strzelecka

Podobnie pary starterów HD8 i HD9 jednoznacznie identyfikowały te allele dając prążki wielkości 223 bp (tab. 1). Reasumując, frekwencja poszczególnych alleli puoroindolinowych w badanym materiale kształtowała się następująco: u wszystkich 69 odmian pszenicy zarejestrowanych w Polsce występował allel *Pina-D1a*, 35 odmian posiadało allel *Pinb-D1a*, natomiast allel *Pinb-D1b* zidentyfikowano u 34 badanych form (tab. 3).

Tabela 3

Skład puroindolinowych alleli loci *Pina-D1* and *Pinb-D1* zidentyfikowanych w badanych odmianach pszenicy

Allele compositions at the puroindoline loci *Pina-D1* and *Pinb-D1* in investigated wheat cultivars

Odmiany pszenicy zwyczajnej z allelami <i>Pina-D1a</i> i <i>Pinb-D1a</i> Common wheat cultivars with alleles <i>Pina-D1a</i> and <i>Pinb-D1a</i>			
Alkazar (M/S)	Clever (M/S)	Korweta (M/S)	Sława (M/S)
Biscay(M/S)	Cytra (M/S)	Milvus (M/S)	Sukces (M/S)
<i>Bellevue</i> (S)	<i>Galaxie</i> (S)	Monsun (M/S)	Tonacja (M/H)
<i>Benhur</i> (S)	Garantus (M/S)	Naridiana (M/S)	Trend (M/S)
Bogatka (M/S)	Hewilla (M/H)	Nutka (M/H)	Tybal (M/S)
Bombona (M/H)	Izyda (M/S)	Olcha (S)	Zadra (M/S)
Boomer (M/S)	Jawa (M/S)	Parabola (M/H)	Zorza (S)
Broma (M/S)	Jubilatka (M/S)	Pasteur (M/S)	Żura (M/S)
Bryza (M/S)	Kaja (M/S)	Radunia (M/S)	Zyta (M/S)
<i>Chinese Spring</i> (S)	Koksa (M/S)	Rapsodia (S)	
Odmiany pszenicy zwyczajnej z allelami <i>Pina-D1a</i> i <i>Pinb-D1b</i> Common wheat cultivars with alleles <i>Pina-D1a</i> and <i>Pinb-D1b</i>			
Almari (M/H)	<i>Franklin</i> (H)	Mikula (M/H)	Partyzan (H)
Anthus (M/H)	Fregata (M/H)	Monsun (M/H)	Rubens (M/H)
Batuta (M/H)	Henika (M/H)	Muza (M/H)	Sakwa (M/H)
Brillant (H)	Kobiera (M/H)	Nadobna (M/H)	Slade (M/H)
Buteo (M/H)	Legenda (M/H)	Nateja (M/S)	Tortija (M/H)
Dorota (M/H)	Ludwig (M/H)	Nawra (M/S)	Trappe (H)
Figura (H)	Markiza (H)	<i>Norvin</i> (H)	Turkis (M/H)
Finezja (M/H)	Meteor (H)	Oliwin (M/H)	Wydma (H)
Flair (M/H)	Mewa (M/S)	Ostka Strzelecka (H)	Zawisza (M/H)
Odmiany pszenicy zwyczajnej z allelami <i>Pina-D1b</i> i <i>Pinb-D1a</i> Common wheat cultivars with alleles <i>Pina-D1b</i> and <i>Pinb-D1a</i>			
<i>AC Corine</i> (H)	<i>Fortuna</i> (H)	<i>Glenlea</i> (H)	<i>Super X</i> (H)
<i>Amazon</i> (H)	<i>Glenavon</i> (H)	<i>Yecora Royo</i> (H)	<i>Wildcat</i> (H)

Oznaczenie twardości (S- miękkie, M-średnie, H- twarde) w oparciu o rozkład danych dla poszczególnych ziarniaków
Hardness (S - soft, M - mixed, H - hard) marked on basis of data distribution for individual grains

Kursywą oznaczono zagraniczne odmiany wzorcowe; Foreign standard cultivars are distinguished by italic characters

Porównanie wyników oznaczeń twardości ziarniaków wykonanych metodą SKCS z danymi uzyskanymi przy zastosowaniu markerów molekularnych (tab. 3) wskazuje na przydatność markerów w praktyce hodowlanej. W zdecydowanej większości przypadków krajowe odmiany zawierające allele *Pina-D1a* i *Pinb-D1a* charakteryzują się bardziej miękkim ziarnem niż odmiany posiadające allele *Pina-D1a* i *Pinb-D1b*. Uzyskane dane są zgodne z doniesieniami literaturowymi (Lillemo i Morris, 2000; Morris i in., 2001; Gazza i in., 2005; Swan i in., 2006; Li i in., 2007; Wang i in., 2008). Z uwagi na fakt że większość krajowych odmian pszenicy wykazuje twardość pośrednią, dla lepszego różnicowania odmian pod względem twardości, należy w dalszych badaniach zastosować nowe zestawy markerów molekularnych uwzględniające występowanie mutacji w obu genach kodujących białka puroindolinowe.

WNIOSKI

1. Znaczną większość zarejestrowanych w Polsce odmian pszenicy należy zaliczyć, na podstawie indeksu SKCS twardości do pośredniej klasy twardości ziarna z wyjątkiem

- dwóch odmian; Rapsodia, która posiada ziarniaki typowo miękkie oraz Brillant — ziarniaki typowo twarde.
2. W badanych odmianach miękkiej, dziki-typ puroindolin a i b (*Pina-D1a* i *Pinb-D1a*) stwierdzono u połowy krajowych odmian pszenic (35 odmian).
 3. Przedstawione wyniki potwierdzają, że zastosowane dwa zestawy markerów molekularnych umożliwiające identyfikacje czterech form allelicznych genów *Pina* (*Pina-D1a* i *Pina-D1b*) oraz *Pinb* (*Pinb-D1a* i *Pinb-D1b*) kodujących białka puroindolinowe mogą być przydatne we wstępnej ocenie twardości/miękkości ziarna pszenicy.

LITERATURA

- Capparelli R., Borriello M., Giroux M. J., Amoroso M. G. 2003. Puroindoline A-gene expression is involved in association of puroindolines to starch. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1463 — 1468.
- Chang C., Zhang H., Xu J., Li W., Liu G., You M., Li B. 2006. Identification of allelic variations of puroindoline genes controlling grain hardness in wheat using a modified denaturing PAGE. *Euphytica* 152: 225 — 234.
- Chen F., He Z. H., Xia C. F., Xia L. Q., Zhang X. Y., Lillemo M., Morris C. F. 2006. Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 112: 400 — 409.
- Chen F., Yu Y., Xia X. 2007. Prevalence of a novel puroindoline b allele in Yunnan endemic wheat (*Triticum aestivum* ssp. *yunnanense* King). *Euphytica* 156: 39 — 46.
- Dubcovsky J., Tranquillini D., Lijavetzky D., Muzzi G. 1999. Genetic and physical characterization of grain texture-related loci diploid wheat. *Mol. Gen. Genet.* 262: 846 — 850.
- Gazza L., Nocente F., Ng P.K.W., Pogna N.E. 2005. Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivar lacking puroindoline a. *Theor. Appl. Genet.* 110: 470 — 478.
- Giroux M.J., Morris C. F. 1997. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theor. Appl. Genet.* 95: 857 — 862.
- Giroux M.J., Morris C., 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components *Pina* and *b*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 6262 — 6266.
- Horn P., Rafalski A. 1992. Non-destructive RAPD genetic diagnostics of microspore-derived *Brassica* embryos. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10: 285 — 293.
- Law J., Yang C.F., Brown J. W. S., Snape J. W., Worland A. J. 1978. The study of grain protein control in wheat using whole chromosome substitution lines. Seed protein improvement by nuclear technique. IAEA, Vienna: 483 — 502.
- Li G., He Z., Lillemo M., Sun Q., Xia X. 2007. Molecular characterization of allelic variations at *Pina* and *Pinb* loci in Shandong wheat land races, historical and current cultivars. *Journal of Cereal Science* 47: 510 — 517.
- Lillemo M., Morris C. F. 2000. A leucine to proline mutation in *Puroindoline b* is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1100 — 1107.
- Massa A. N., Morris R., Gill B. S. 2004. Sequence diversity of puroindoline-a, puroindoline-b, and the grain softness protein genes in *Aegilops tauschii* cross. *Crop Sci.* 44: 1808 — 1816.
- Morris C. F., Lillemo M., Simeone M.C., Giroux M.J., Babb S.L., Kidwell K.K. 2001. Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheat. *Crop Sci.* 41: 218 — 228.
- Morris C. F., Rose S. P. 1996. Wheat. In: *Cereal Grain Quality* (eds. Henry, Kettewell). Chapman and Hall, New York: 3 — 54.
- Perretant M. R., Cadalen T., Charmet G., Sourdille P., Nicolas P., Boeuf C., Tixier M. H. 2000. QTL analysis of bread-making quality in wheat using a doubled haploid population. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1167 — 1175.

- Swan C. G., Meyer F. D., Hogg A. C., Martin M. J., Giroux M. J. 2006. Puroindoline B limits binding of puroindoline A to starch and grain softness. *Crop Sci.* 46: 1656 — 1665.
- Sourdille P., Perretant M. R., Charmet G., Leroy P., Gautier M. F., Joudrier P., Nelson J. C., Sorrells M. E., Bernard M. 1996. Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 93: 580 — 586.
- Wang L., Li G., Xia X., He Z., Mu P. 2008. Molecular characterization of Pina and Pinb allelic variations in Xinjiang landraces and commercial wheat cultivars. *Euphytica* 164: 745 — 752.