

JACEK WAGA

Zakład Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Krakowie

Dziedziczenie wybranych frakcji białek gliadynowych u mieszańców orkiszu z pszenicą zwyczajną

Inheritance of certain gliadin proteins in spelt and common wheat hybrid genotypes

Analizowano dziedziczenie frakcji białkowych należących do grupy β -gliadyn u odmian i rodów pszenicy ozimej z kolekcji Zakładu Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż IHAR w Krakowie (ZOJiMHZ). Dwie linie orkiszu: kbh-sp1 i kbh-sp2 krzyżowano z dwoma formami pszenicy zwyczajnej — rodem LAD 480 i odmianą Flair. Obrazy elektroforetyczne rodziców różniły się między sobą w strefie β -gliadyn. Analizowano częstotliwość występowania różnych kombinacji frakcji białkowych u mieszańców F_2 . Zidentyfikowano sześć bloków gliadyn: cztery kodowane chromosomem 6B i dwa kodowane chromosomem 6D. Wyniki testu χ^2 potwierdziły, że bloki należące do poszczególnych grup chromosomowych są allelicznymi wariantami genów zlokalizowanych na chromosomach 6B i 6D. Obliczono wartości wskaźnika R_m dla wszystkich prążków wchodzących w skład zidentyfikowanych bloków, na podstawie których włączono je do utworzonego wcześniej katalogu białek gliadynowych.

Słowa kluczowe: analiza elektroforetyczna, β -gliadyny, dziedziczenie białek gliadynowych, katalog bloków białek gliadynowych

Inheritance of some β -gliadin protein fractions observed in Polish winter wheat cultivars and strains was analyzed. Two cross combinations: kbh-sp1 $\times$ LAD 480 and kbh-sp2 $\times$ Flair were made. Lines kbh-sp1 and kbh-sp2 were the biotypes selected from spelt cultivar Oberkummeler Rotkorn, and LAD 480 and Flair were the genotypes of common wheat. Parental forms differed from each other in β -gliadins. A frequency of different β -gliadin combinations in F_2 generation was estimated, and six blocks: four coded by chromosome 6B and two coded by chromosome 6D, were identified. Results of χ^2 test confirmed the hypothesis that blocks belonging to particular chromosome groups are inherited as single Mendelian units. R_m values were calculated for all electrophoretic bands belonging to the identified blocks. New blocks were included to the existent catalogue of gliadin proteins.

Key words: electrophoretic analysis, β -gliadins, inheritance of gliadin proteins, catalogue of gliadin protein blocks

WSTĘP

Białka zapasowe pszenicy należące do grupy prolamin (gliadyny i gluteniny są zbudowane z polipeptydów o różnej masie cząsteczkowej i ładunku elektrycznym. Analiza elektroforetyczna dzieli je na frakcje i podjednostki, które tworzą specyficzne kombinacje powiązane z cechami użytkowymi, głównie jakością technologiczną (Waga, 1997). Dzięki temu obrazy elektroforetyczne są wykorzystywane w hodowli jako markery biochemiczne cech jakościowych, a także — z uwagi na znaczny polimorfizm białek zapasowych — do identyfikacji materiałów hodowlanych, badania tożsamości odmianowej i wyrównania genetycznego (Payne i in., 1980; Brzeziński, 2003).

Istotną rolę w wymienionych aplikacjach odgrywa interpretacja obrazów elektroforetycznych uwzględniająca zasady dziedziczenia białek zapasowych pszenicy. Geny warunkujące syntezę gliadyn i glutenin skupione są w obrębie loci zlokalizowanych na chromosomach pierwszej i szóstej grupy homeologicznej (Payne i in., 1984). W przypadku gliadyn zidentyfikowano sześć, a w przypadku glutenin — trzy takie loci. Każdy locus składa się z kilku silnie sprzężonych genów, rzadko ulegających rozszczepieniu w wyniku crossing-over. Na skutek mutacji nieletalnych loci białek zapasowych ulegały różnicowaniu. W efekcie powstały serie alleli wielokrotnych, których produktami ekspresji są liczne, zróżnicowane pod względem budowy fizykochemicznej, polipeptydy tworzące prążki obrazu elektroforetycznego. Grupę prążków kodowanych jednym allelem określa się mianem bloku białkowego.

Prawidłowa identyfikacja glutenin wysokocząsteczkowych nie przysparza większych problemów. Tworzą je na ogół pary prążków występujące w łatwych do odróżnienia kombinacjach (Payne i Lawrence, 1983). Bardziej złożonym problemem jest interpretacja gliadyn. Wynika to zarówno z większej liczby zidentyfikowanych bloków, jak również większej liczby prążków w obrębie poszczególnych bloków (od jednego do sześciu). Problem dodatkowo komplikuje nakładanie się frakcji o jednakowej masie i ładunku, lecz kodowanych różnymi chromosomami. W szczególności dotyczy to białek z grupy β i γ -gliadyn (Sozinov, 1987).

Opisane bloki zebrane są w katalogach. Dwa z nich zasługują na szczególną uwagę. Pierwszy, historycznie wcześniejszy katalog Poperelli, został opracowany z początkiem lat osiemdziesiątych i służył do interpretacji rozdziałów elektroforetycznych na żelu skrobiowym (Sozinov i Poperella, 1980). Drugi, opracowany przez Metakovsky'ego, powstał w latach dziewięćdziesiątych jako efekt kontynuacji badań Poperelli z wykorzystaniem elektroforezy na żelu poliakryloamidowym. (Metakovsky, 1991). Jego zastosowanie do oceny zróżnicowania gliadyn u różnych form pszenicy często bywa jednak utrudnione z uwagi na znaczną liczebność wariantów białkowych nieznacznie różniących się między sobą lokalizacją pojedynczych prążków bądź intensywnością ich wybarwienia w żelu. Ponadto odmiany i rody pszenicy ozimej badane w Polsce często zawierają frakcje specyficzne, nie ujęte w katalogu. Stąd też bezpośrednie porównanie zilustrowanych w nim schematów z prążkami obserwowanymi na obrazie elektroforetycznym, i używanie symboli zamieszczonych w katalogu, może niekiedy prowadzić do błędów interpretacji. W ZOJiMHZ podjęto próbę opracowania własnej

metody identyfikacji gliadyn, a jej zasady przedstawiono w jednej z wcześniejszych prac (Waga, 2000). Gliadyny identyfikowano porównując obrazy elektroforetyczne odmian i rodów pszenicy różniących się pojedynczymi frakcjami białkowymi. Na tej podstawie opisano grupy prążków różnicujących badane genotypy, które prawdopodobnie wchodziły w skład bloków gliadyn. Obecnie poszerzono zakres badań nad identyfikacją bloków o analizę genetyczną mieszańcowego potomstwa F_2 uzyskanego z form pszenicy różniących się wzorcami obrazów elektroforetycznych. Jej wyniki są dowodem przemawiającym za poprawnością klasyfikacji rozpatrywanych frakcji białkowych.

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie, które prążki elektroforetyczne z grupy β -gliadyn, obserwowane u czterech form pszenicy z kolekcji ZOJiMHZ, tworzą bloki białkowe kodowane allelicznymi wariantami jednego genu, a które są kodowane genami zlokalizowanymi na różnych chromosomach.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Badano dwie populacje mieszańcowe F_2 pszenicy ozimej. Komponentami rodzicielskimi w wykonanych kombinacjach krzyżowań były dwa biotypy orkisz, uzyskane drogą selekcji z odmiany Oberkummler Rotkorn (oznaczone symbolami kbh-sp1 i kbh-sp2) oraz dwie formy pszenicy zwyczajnej: ród LAD 480 oraz odmiana Flair. Wymienione formy różniły się składem frakcji gliadynowych. W 2002 roku wykonano następujące kombinacje krzyżowań:

1. kbh-sp 1 $\times$ LAD 480
2. kbh-sp 2 $\times$ Flair

W roku 2003 zebrano rośliny pokolenia F_1 , a uzyskane z nich ziarniaki należące do pokolenia F_2 badano metodą rozdziału elektroforetycznego.

Elektroforeza

W badaniach wykorzystano metodę elektroforezy kwaśnej (A-PAGE) opracowaną przez Bushuka i Zillmana, dostosowaną do warunków laboratorium ZOJiMHZ w Krakowie (Bushuk i Zillmann, 1978). Białka ekstrahowano 70% roztworem etanolu przez całą dobę i rozdzielano na żelu poliakryloamidowym w buforze mleczanowo-glinowym o pH = 3,1.

Dla każdej kombinacji analizowano po 300 ziarniaków. W analizie dziedziczenia gliadyn wykorzystano 212 obrazów elektroforetycznych potomstwa kbh-sp1 $\times$ LAD 480 oraz 282 obrazy elektroforetyczne potomstwa kbh-sp2 $\times$ Flair.

Charakterystyka β -gliadyn

W analizie uwzględniono tylko te frakcje, które w sposób jednoznaczny różnicowały komponenty rodzicielskie w strefie β obrazu elektroforetycznego.

Rozpatrywane prążki oznaczono symbolami składającymi się z litery pochodzącej od formy pszenicy użytej do krzyżowań („O” dla linii orkisz, „L” dla rodu LAD 480, „F” dla odmiany Flair) oraz indeksu. Pierwsza cyfra tego indeksu oznacza numer kombinacji (zgodnie z oznaczeniem w akapicie „Materiał roślinny”), natomiast druga numer prążka. Prążki numerowano zgodnie z kierunkiem migracji cząstek w żelu, a więc frakcje położone

wyżej na obrazie elektroforetycznym (migrujące wolniej) otrzymywały niższe wartości indeksu, natomiast frakcje położone niżej (migrujące szybciej) wartości wyższe. Np. prążek należący do linii kbh-sp1 zlokalizowany w górnej strefie β -gliadyn (migrujący wolniej) oznaczono symbolem $O_{1.1}$, natomiast podobnie zlokalizowany prążek rodu LAD 480 — „ $L_{1.1}$ ”.

Identyfikacja bloków białkowych

Mieszańce pokolenia F_2 dzielono na grupy. Osobniki włączone do jednej grupy zawierały identyczne kombinacje prążków natomiast osobniki należące do różnych grup różniły się pod względem tej cechy. Określono liczebność genotypów w poszczególnych grupach, a następnie porównywano je ze stosunkami rozszczepień teoretycznie oczekiwanymi dla jednej i dwóch par genów. Dla dwóch alleli jednego genu kodującego gliadyny, które dziedziczą się w sposób pośredni oczekiwano rozszczepienia w stosunku 1:2:1, natomiast dla dwóch par genów 1:2:1:2:4:2:1:2:1. W przypadkach, w których specyficzna kombinacja prążków elektroforetycznych utrudniała jednoznaczne odróżnienie typu homozygoty od heterozygoty łączono te dwie klasy w jedną. Wówczas teoretyczny stosunek rozszczepień zmieniał się z 1:2:1 na 3:1 oraz z 1:2:1:2:4:2:1:2:1 na 3:6:3:1:2:1 odpowiednio dla jednej i dwóch par genów. Zgodność teoretycznie oczekiwanych stosunków rozszczepień obrazów elektroforetycznych z rozszczepieniami obserwowanymi w doświadczeniu testowano na podstawie χ^2 .

Grupy prążków wchodzących w skład bloków białkowych wprowadzono do utworzonego wcześniej katalogu (Waga, 2000). Symbole genów kodujących gliadyny użyte w niniejszej pracy są zgodne z powszechnie obowiązującymi w nomenklaturze międzynarodowej (np. *Gli B1* to locus na chromosomie *1B* natomiast *Gli B2* — locus na chromosomie *6B*) (Mc Intosh, 1983). Zidentyfikowane bloki oznaczano numerami katalogowymi. Przykładowo, symbol *Gli B2-1* oznacza pierwszy blok kodowany chromosomem *6B*.

Dla wszystkich analizowanych prążków elektroforetycznych obliczono wskaźniki R_m , na podstawie których wprowadzono je do katalogu bloków białkowych z grupy β -gliadyn.

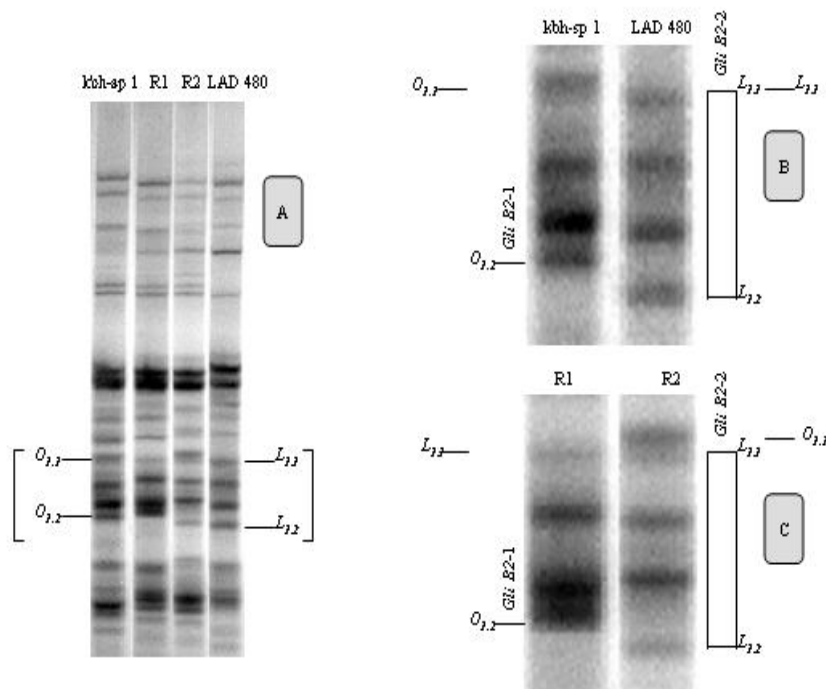
WYNIKI

Kombinacja kbh-sp 1 $\times$ LAD 480

Formy rodzicielskie użyte do krzyżowań — linia kbh-sp1 i ród LAD 480 — różniły się między sobą gliadynami w strefie beta obrazu elektroforetycznego. Frakcje białkowe oznaczono symbolami: $O_{1.1}$, $O_{1.2}$ (linia kbh-sp1) oraz $L_{1.1}$, $L_{1.2}$ (ród LAD 480) (rys. 1 a i b). Dwa niespecyficzne prążki zlokalizowane pomiędzy wyżej wymienionymi, obecne zarówno w linii kbh-sp1, jak i u rodu LAD 480, zostały pominięte w analizie genetycznej.

Wzorując się na katalogu Metakovsky'ego przyjęto założenie, iż prążki zlokalizowane w górnej strefie β -gliadyn ($O_{1.1}$ i $L_{1.1}$) są kodowane chromosomem *6D*, natomiast położone niżej ($O_{1.2}$ i $L_{1.2}$) — chromosomem *6B*. We wszystkich genotypach mieszańcowych zawierających $L_{1.2}$ pojawiał się również $L_{1.1}$ co sugeruje, że tworzą one blok białkowy. Z kolei $L_{1.1}$ obserwowano zarówno w połączeniu z $L_{1.2}$, jak i $O_{1.2}$. Przypuszczalnie prążek $L_{1.1}$ składa się z dwóch zachodzących na siebie frakcji białkowych kodowanych dwoma

genami na chromosomach 6B i 6D. Przemawia za tym obraz rekombinantów łączących w jednym osobniku frakcje obu rodziców — $L_{1.1}iO_{1.2}$ (rys. 1 a i 1 c). W takich genotypach $L_{1.1}$ był słabiej wybarwiony niż, gdy występował wspólnie z $L_{1.2}$ (jak ma to miejsce w formie rodzicielskiej LAD 480). Świadczy to o obniżonej zawartości białka frakcji $L_{1.1}$, która w genotypie rekombinanta jest produktem ekspresji jednego genu, a w formie rodzicielskiej — dwóch genów.



A. Obraz elektroforetyczny gliadyn komponentów rodzicielskich i rekombinantów (R1 i R2). Analizowane frakcje białkowe w strefie β -gliadyn zaznaczono ramkami. B. Powiększenie fragmentu obrazu elektroforetycznego zawierającego frakcje β -gliadyn charakterystyczne dla komponentów rodzicielskich. C. Powiększenie fragmentu obrazu elektroforetycznego zawierającego frakcje β -gliadyn charakterystyczne dla rekombinantów

Rys. 1. Obrazy elektroforetyczne gliadyn obserwowane w potomstwie F_2 kombinacji krzyżowań kbh-sp 1 $\times$ LAD 480. Symbole prążków elektroforetycznych i bloków białkowych opisano w tekście

A. Electrophoregrams of parental forms and two recombinant genotypes (R1 and R2). Analyzed β -gliadin fractions are marked by the frames. B. Enlargement of β -gliadin fractions observed in parental forms. C. Enlargement of β -gliadin fractions observed in recombinant genotypes

Fig. 1. Gliadin protein patterns of F_2 single kernels obtained from the combination kbh-sp1 $\times$ LAD 480. Symbols of protein bands and blocks are described in the text

Analizując badaną populację mieszańcową pod względem obecności lub braku prążków $L_{1.1}+L_{1.2}$ i $O_{1.2}$, wyodrębniono trzy klasy genotypów:

- zawierających parę prążków $L_{1.1}+L_{1.2}$, nie zawierających prążka $O_{1.2}$,
- zawierających prążek $O_{1.2}$, nie zawierających pary prążków $L_{1.1}+L_{1.2}$,

- zawierających parę prążków $L_{1.1}+L_{1.2}$ oraz prążek $O_{1.2}$.
Rozpatrując prążki $L_{1.1}$ i $O_{1.1}$ wyodrębniono również trzy klasy genotypów:
- zawierających prążek $L_{1.1}$, nie zawierających prążka $O_{1.1}$,
- zawierających prążek $O_{1.1}$, nie zawierających prążka $L_{1.1}$,
- zawierających prążki $O_{1.1}$ i $L_{1.1}$.

Założono więc hipotezę, iż:

- para prążków $L_{1.1}+L_{1.2}$ oraz prążek $O_{1.2}$ tworzą dwa odrębne bloki białkowe kodowane dwoma allelicznymi wariantami genu zlokalizowanego przypuszczalnie na chromosomie *6B* (locus *Gli B2*). Genotypy zawierające parę prążków $L_{1.1}+L_{1.2}$ są homozygotami typu LAD 480, genotypy zawierające prążek $O_{1.2}$ są homozygotami typu kbh-sp1, natomiast genotypy zawierające parę prążków $L_{1.1}+L_{1.2}$ i $O_{1.2}$ są heterozygotami;
- prążki $L_{1.1}$ i $O_{1.1}$ są kodowane dwoma allelicznymi wariantami genu zlokalizowanego przypuszczalnie na chromosomie *6D* (locus *Gli D2*). Genotypy zawierające prążek $L_{1.1}$ są homozygotami typu LAD 480, genotypy zawierające prążek $O_{1.1}$ są homozygotami typu kbh-sp1, natomiast genotypy zawierające parę prążków $L_{1.1}$ i $O_{1.1}$ są heterozygotami.

Celem weryfikacji założonej hipotezy porównywano zgodność liczebności genotypów obserwowanych w trzech klasach mieszańców z teoretycznie oczekiwanym stosunkiem rozszczepień 1:2:1 dla jednej pary genów i testowano za pomocą χ^2 (tab. 1 i 2).

Wysoka wartość testu w obu przypadkach nie pozwoliła uznać prawdziwości założonej hipotezy, dlatego też w następnej kolejności grupę mieszańców heterozygotycznych przyłączano kolejno do mieszańców reprezentujących homozygoty typu kbh-sp1, a następnie do homozygot typu LAD 480. Liczebność nowo utworzonych grup genotypów porównywano z teoretycznie oczekiwanym rozkładem 3:1 i testowano za pomocą χ^2 (tab. 1 a, 1 b, 2 a i 2 b).

Tabela 1

Test χ^2 dla gliadyn $O_{1.2}$ oraz $L_{1.1} + L_{1.2}$ w potomstwie F_2 kombinacji kbh-sp1 $\times$ LAD 480
Test χ^2 for gliadins $O_{1.2}$ and $L_{1.1} + L_{1.2}$ in F_2 hybrid genotypes coming from the combination kbh-sp1 $\times$ LAD 480

Grupy genotypów Groups of genotypes	Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepień Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
1	O _{1,2}	1	53	62	2,151	0,3–0,5
2	O _{1,2} + (L _{1,1} +L _{1,2})	2	106	98		
3	L _{1,1} +L _{1,2}	1	53	52		
		212	212			

Tabela 1 a

Test χ^2 dla gliadyn $O_{1.2}$ oraz $L_{1.1} + L_{1.2}$ w potomstwie F_2 kombinacji $kbh-sp1 \times Lad\ 480$ po połączeniu 1. i 2. grupy genotypów

Test χ^2 for gliadins $O_{1.2}$ and $L_{1.1} + L_{1.2}$ in F_2 hybrid genotypes coming from the combination $kbh-sp1 \times LAD\ 480$ when first and second group of genotypes were joined together

Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepeń Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
$2 \times O_{1.2} + (L_{1.1} + L_{1.2})$	3	159	160	0,024	0,8–0,9
$L_{1.1} + L_{1.2}$	1	53	52		
		212	212		

Tabela 1 b

Test χ^2 dla gliadyn $O_{1.2}$ oraz $L_{1.1} + L_{1.2}$ w potomstwie F_2 kombinacji $kbh-sp1 \times Lad\ 480$ po połączeniu 2. i 3. grupy genotypów

Test χ^2 for gliadins $O_{1.2}$ and $L_{1.1} + L_{1.2}$ in F_2 hybrid genotypes coming from the combination $kbh-sp1 \times LAD\ 480$ when second and third group of genotypes were joined together

Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepeń Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
$O_{1.2} + 2 \times (L_{1.1} + L_{1.2})$	3	159	150	2,037	0,1–0,2
$O_{1.2}$	1	53	62		
		212	212		

Tabela 2

Test χ^2 dla gliadyn $O_{1.1}$ oraz $L_{1.1}$ w potomstwie F_2 kombinacji $kbh-sp1 \times Lad\ 480$

Test χ^2 for gliadins $O_{1.1}$ and $L_{1.1}$ in F_2 hybrid genotypes coming from the combination $kbh-sp1 \times LAD\ 480$

Grupy genotypów Groups of genotypes	Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepeń Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
1	$L_{1.1}$	1	53	48	5,17	0,05–0,1
2	$L_{1.1} + O_{1.1}$	2	106	122		
3	$O_{1.1}$	1	53	42		
			212	212		

Tabela 2 a

Test χ^2 dla gliadyn $O_{1.1}$ oraz $L_{1.1}$ w potomstwie F_2 kombinacji $kbh-sp1 \times Lad\ 480$ po połączeniu 1. i 2. grupy genotypów

Test χ^2 for gliadins $O_{1.1}$ and $L_{1.1}$ in F_2 hybrid genotypes coming from the combination $kbh-sp1 \times LAD\ 480$ when first and second group of genotypes were joined together

Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepeń Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
$2 \times L_{1.1} + O_{1.1}$	3	159	170	3,044	0,05–0,01
$O_{1.1}$	1	53	42		
		212	212		

Tabela 2 b

Test χ^2 dla gliadyn $O_{1.1}$ oraz $L_{1.1}$ w potomstwie F_2 kombinacji $kbh-sp1 \times Lad\ 480$ po połączeniu 2. i 3. grupy genotypów

Test χ^2 for gliadins $O_{1.1}$ and $L_{1.1}$ in F_2 hybrid genotypes coming from the combination $kbh-sp1 \times LAD\ 480$ when second and third group of genotypes were joined together

Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepień Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
$L_{1.1} + 2 \times O_{1.1}$	3	159	164	0,629	0,3-0,5
$L_{1.1}$	1	53	48		
		212	212		

Wysoką zgodność dla prążków $L_{1.1}+L_{1.2}$ i $O_{1.2}$ ($p = 0,8-0,9$) uzyskano, gdy heterozygoty połączono z homozygotami typu $kbh-sp1$ (tab. 1 a). W przypadku prążków $L_{1.1}$ i $O_{1.1}$ niższą wartość χ^2 uzyskano po przyłączeniu grupy heterozygot do homozygot typu LAD 480 (tab. 2 b). Niemniej jednak prawdopodobieństwo zgodności z oczekiwanym stosunkiem 3:1 było wciąż zbyt niskie ($p = 0,3-0,5$), by w sposób jednoznaczny przyjąć, iż rozpatrywane frakcje gliadynowe są allelicznymi wariantami jednego genu, a więc blokami białkowymi.

Można więc oczekiwać, iż w przypadku rozpatrywanej kombinacji krzyżowań jedynie para $L_{1.1} + L_{1.2}$ oraz prążek $O_{1.2}$ są allelicznymi wariantami jednego genu (prawdopodobnie zlokalizowanego na chromosomie 6B), a tym samym, że tworzą one bloki białkowe. Nadano im symbole:

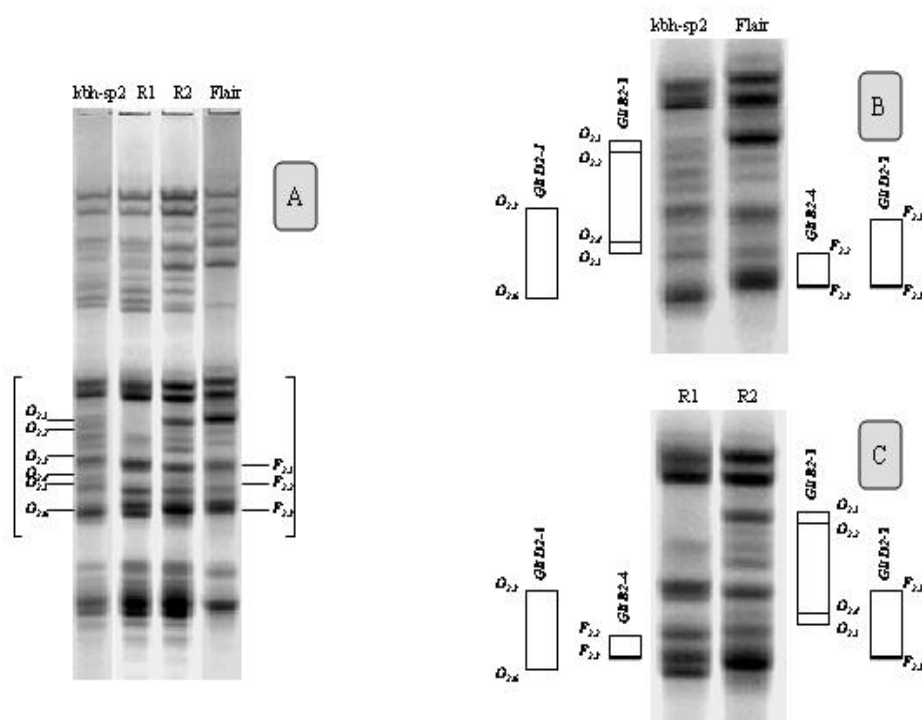
frakcja $O_{1.2}$ — blok *Gli B2-1*,
frakcje $L_{1.1}+L_{1.2}$ — blok *Gli B2-2*.

Kombinacja $kbh-sp2 \times Flair$

Formy rodzicielskie w drugiej kombinacji krzyżowań — linia $kbh-sp2$ i odmiana Flair — także różniły się układem prążków elektroforetycznych w strefie β -gliadyn. Oznaczono je symbolami: $O_{2.3}$, $O_{2.4}$, $O_{2.5}$ i $O_{2.6}$ (linia $kbh-sp2$) oraz $F_{2.1}$, $F_{2.2}$, $F_{2.3}$ (odmiana Flair) (rys. 2 a i b). Stwierdzono, iż w pokoleniu F_2 prążki $O_{2.4}$ i $O_{2.5}$ występowały razem zarówno w kombinacji z $O_{2.3}$ i $O_{2.6}$ (podobnie jak w linii rodzicielskiej $kbh-sp2$) jak i z $F_{2.1}$ i $F_{2.3}$ (tworząc układ jakiego można oczekiwać w przypadku genotypu rekombinantów). Ponadto obserwowano, iż wspomniana para $O_{2.4}$ i $O_{2.5}$ występowała zawsze w połączeniu z dwoma prążkami zlokalizowanymi w strefie γ -gliadyn oznaczonymi jako $O_{2.1}$ i $O_{2.2}$. Z kolei para prążków $F_{2.2}$ i $F_{2.3}$ występowała zarówno w połączeniu z $F_{2.1}$ i $F_{2.3}$ (jak u formy rodzicielskiej Flair) jak i z prążkami $O_{2.3}$ i $O_{2.6}$ (genotyp rekombinantów) (rys. 2 c). Spostrzeżenia te mogą sugerować, iż prążek $F_{2.3}$ tworzą dwie "nakładające się" frakcje białkowe kodowane dwoma różnymi genami, a także że bloki białkowe tworzą grupy prążków: $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ i $F_{2.2}+F_{2.3}$ (przypuszczalnie dwa alleliczne warianty genu na chromosomie 6B) oraz $O_{2.3}+O_{2.6}$ (przypuszczalnie dwa allele genu na chromosomie 6D).

Analizując mieszańce F_2 pod względem obecności lub braku prążków $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ oraz $F_{2.2}+F_{2.3}$, wyodrębniono dwie klasy genotypów:

- zawierających $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ oraz $F_{2.2}+F_{2.3}$. Mieszańce zawierające obie grupy prążków połączono w jedną z uwagi na nakładanie się $O_{2.5}$ i $F_{2.2}$,
- zawierających $F_{2.2}+F_{2.3}$ i nie zawierających $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$.



A. Obraz elektroforetyczny gliadyn komponentów rodzicielskich i rekombinantów (R1 i R2). Analizowane frakcje białkowe w strefie β -gliadyn zaznaczono ramkami. B. Powiększenie fragmentu obrazu elektroforetycznego zawierającego frakcje β -gliadyn charakterystyczne dla komponentów rodzicielskich. C. Powiększenie fragmentu obrazu elektroforetycznego zawierającego frakcje β -gliadyn charakterystyczne dla rekombinantów

Rys. 2. Obrazy elektroforetyczne gliadyn obserwowane w potomstwie F_2 kombinacji krzyżowań kbh-sp2 $\times$ Flair. Symbole prążków elektroforetycznych i bloków białkowych opisano w tekście

A. Electrophoregrams of parental forms and two recombinant genotypes (R1 and R2). Analyzed β -gliadin fractions are marked by the frames. B. Enlargement of β -gliadin fractions observed in parental forms. C. Enlargement of β -gliadin fractions observed in recombinant genotypes

Fig. 2. Gliadin protein patterns of F_2 single kernels obtained from the combination kbh-sp2 $\times$ Flair. Symbols of protein bands and blocks are described in the text

Z kolei rozpatrując grupy prążków $O_{2.3}+O_{2.6}$ i $F_{2.1}+F_{2.3}$ wyodrębniono trzy klasy mieszańców:

- zawierających $O_{2.3}+O_{2.6}$, nie zawierających $F_{2.1}+F_{2.3}$,
- zawierających $F_{2.1}+F_{2.3}$, nie zawierających $O_{2.3}+O_{2.6}$,
- zawierających $O_{2.3}+O_{2.6}$ i $F_{2.1}+F_{2.3}$.

Założono hipotezę, iż:

- grupa prążków $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ oraz para $F_{2.2}+F_{2.3}$ są kodowane dwoma allelicznymi wariantami genu zlokalizowanego przypuszczalnie na chromosomie 6B (locus *Gli B2*). Genotypy zawierające prążki $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ i $F_{2.2}+F_{2.3}$ obejmują

homozygoty typu kbh-sp2 i heterozygoty, natomiast genotypy zawierające $F_{2.2}+F_{2.3}$ są homozygotami typu Flair,

- pary prążków $O_{2.3}+O_{2.6}$ i $F_{2.1}+F_{2.3}$ są kodowane dwoma allelicznymi wariantami genu zlokalizowanego przypuszczalnie na chromosomie 6D (locus *Gli D2*). Genotypy zawierające parę prążków $O_{2.3}+O_{2.6}$ są homozygotami typu kbh-sp2, genotypy zawierające parę prążków $F_{2.1}+F_{2.3}$ są homozygotami typu Flair natomiast genotypy zawierające $O_{2.3}+O_{2.6}$ i $F_{2.1}+F_{2.3}$ są heterozygotami.

Celem weryfikacji założonej hipotezy porównywano zgodność liczebności genotypów obserwowanych w trzech klasach mieszańców z teoretycznie oczekiwanym dla jednej pary genów stosunkiem rozszczepień 3:1 w pierwszym i 1:2:1 w drugim przypadku i testowano za pomocą χ^2 (tab. 3 i 4).

Tabela 3

Test χ^2 dla gliadyn $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ oraz $F_{2.2}+F_{2.3}$ w potomstwie F_2 kombinacji kbh-sp2 $\times$ Flair po połączeniu homozygot typu Flair i heterozygot

Test χ^2 for gliadins $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ and $F_{2.2}+F_{2.3}$ in F_2 hybrid genotypes coming from the combination kbh-sp2 $\times$ Flair when homozygotes of Flair type and heterozygotes were joined together

Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepień Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
$2 \times (O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}) + (F_{2.2}+F_{2.3})$	3	211,5	210	0,043	0,8-0,9
$F_{2.2}+F_{2.3}$	1	70,5	72		
		282	282		

Tabela 4

Test χ^2 dla gliadyn $O_{2.3}+O_{2.6}$ oraz $F_{2.1}+F_{2.3}$ w potomstwie F_2 kombinacji kbh-sp2 $\times$ Flair

Test χ^2 for gliadins $O_{2.3}+O_{2.6}$ and $F_{2.1}+F_{2.3}$ in F_2 hybrid genotypes coming from the combination kbh-sp2 $\times$ Flair

Prążki gliadynowe Gliadin bands	Stosunek rozszczepień Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
$O_{2.3}+O_{2.6}$	1	70,5	70	0,157	0,9-0,95
$(O_{2.3}+O_{2.6}) + (F_{2.1}+F_{2.3})$	2	141	144		
$F_{2.1}+F_{2.3}$	1	70,5	68		
		282	282		

Wynik testu potwierdził zgodność teoretycznej i obserwowanej częstotliwości genotypów w poszczególnych klasach w obu przypadkach, co dowodzi że rozpatrywane grupy prążków stanowią bloki białek gliadynowych. Oznaczono je następującymi symbolami:

frakcje $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ — blok *Gli B2-3*,

frakcje $F_{2.2}+F_{2.3}$ — blok *Gli B2-4*,

frakcje $O_{2.3}+O_{2.6}$ — blok *Gli D2-1*,

frakcje $F_{2.1}+F_{2.3}$ — blok *Gli D2-2*.

Analizując obrazy elektroforetyczne mieszańców F_2 pod względem czterech wymienionych bloków gliadyn podzielono grupę badanych mieszańców na sześć klas:

- zawierających $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$, $F_{2.2}+F_{2.3}$ oraz $O_{2.3}+O_{2.6}$ — rekombinanty typu *Gli B2-3+(3+4)/Gli D2-1*,
- zawierających $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$, $F_{2.2}+F_{2.3}$, $O_{2.3}+O_{2.6}$ oraz $F_{2.1}+F_{2.3}$ — rekombinant typu *Gli B2-3+(3+4)/Gli D2-1+2* (podwójna heterozygota),
- zawierających $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ oraz $F_{2.1}+F_{2.3}$ — rekombinant typu *Gli B2-3+(3+4)/Gli D2-2*,
- zawierających $F_{2.2}+F_{2.3}$ i $O_{2.3}+O_{2.6}$ — rekombinant typu *Gli B2-4/Gli D2-1*,
- zawierających $F_{2.2}+F_{2.3}$ i $O_{2.3}+O_{2.6}$ oraz $F_{2.1}+F_{2.3}$ — rekombinant typu *Gli B2-4/Gli D2-1+2*,
- zawierających $F_{2.2}+F_{2.3}$ i $F_{2.1}+F_{2.3}$ — rekombinant typu *Gli B2-4/Gli D2-2*.

Celem stwierdzenia, czy zidentyfikowane bloki gliadyn są kodowane dwoma genami zlokalizowanymi na różnych chromosomach (6B i 6D) testowano zgodność obserwowanych częstotliwości mieszańców w sześciu klasach z teoretycznym stosunkiem 3:6:3:1:2:1 dla dwóch par genów (uzyskany z połączenia 3:1 z 1:2:1) na podstawie χ^2 (tab. 5). Wynik testu potwierdza założoną hipotezę o niezależnym dziedziczeniu genów kodujących dwie pary allelicznych bloków białkowych zlokalizowanych na różnych chromosomach.

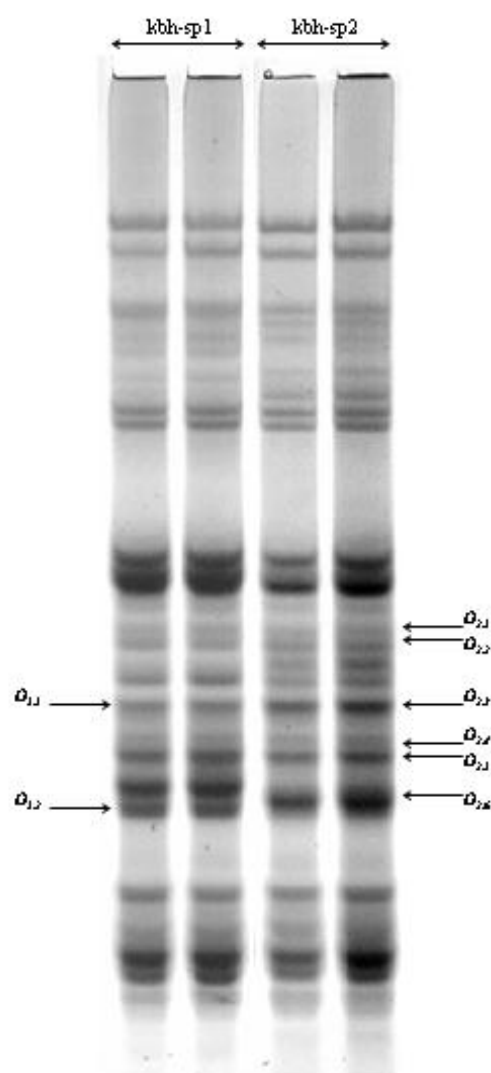
Tabela 5

Test χ^2 dla bloków gliadyn kodowanych chromosomami 6B (locus Gli B2) i 6D (locus Gli D2) w potomstwie F₂ kombinacji kbh-sp2 × Flair
Test χ^2 for gliadin blocks coded by chromosomes 6B (locus Gli B2) and 6D (locus Gli D2) in F₂ hybrid genotypes coming from the combination kbh-sp2 × LAD 480

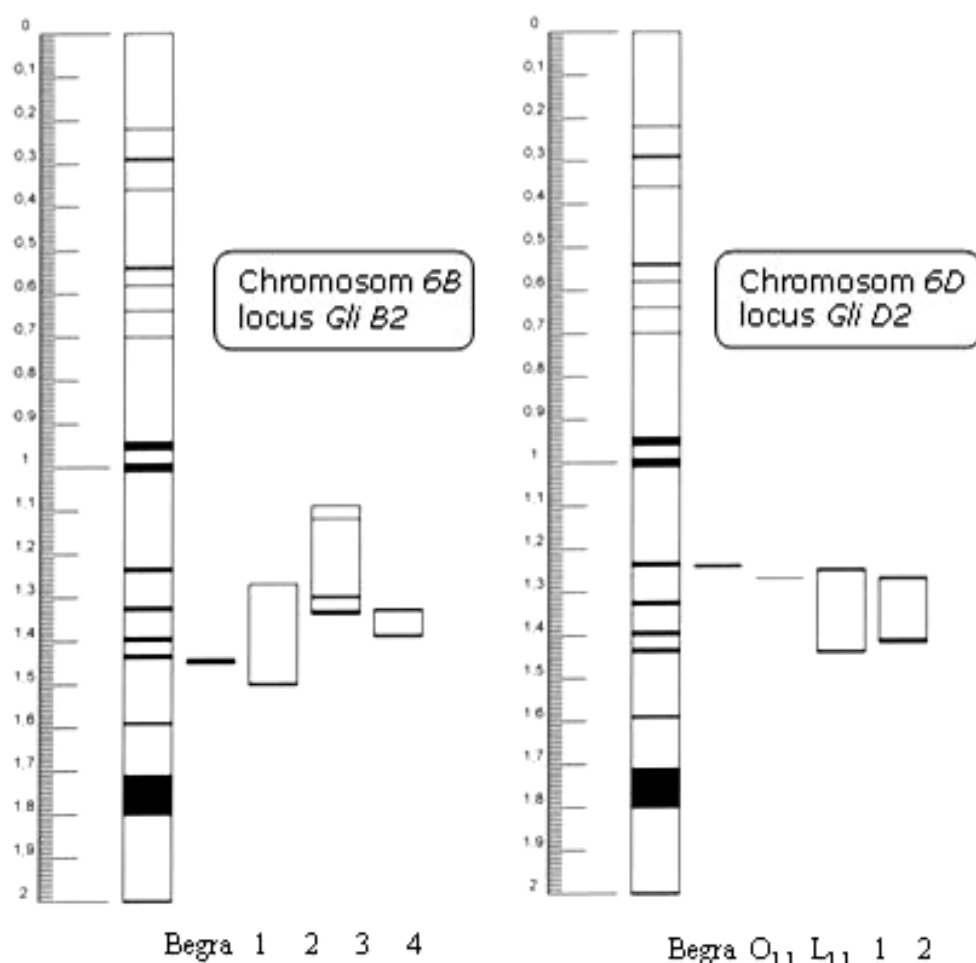
Locus-blok gliadyn Locus-gliadin block		Stosunek rozszerzenie Segregation	Liczebność oczekiwana Expected	Liczebność obserwowana Observed	χ^2	P
<i>Gli B2</i>	<i>Gli D2</i>					
<i>Gli B2-3+(3+4)</i>	<i>Gli D2-1</i>	3	52,875	56	1,764	0,8-0,9
<i>Gli B2-3+(3+4)</i>	<i>Gli D2-1+2</i>	6	105,75	104		
<i>Gli B2-3+(3+4)</i>	<i>Gli D2-2</i>	3	52,875	50		
<i>Gli B2-4</i>	<i>Gli D2-1</i>	1	17,625	14		
<i>Gli B2-4</i>	<i>Gli D2-1+2</i>	2	35,25	40		
<i>Gli B2-4</i>	<i>Gli D2-2</i>	1	17,625	18		
		282	282			

Porównanie kombinacji β -gliadyn u dwóch biotypów orkiszu

Badane linie orkiszu wykazują znaczne podobieństwo frakcji białkowych w strefie β -gliadyn. Bezpośrednie porównanie obrazów elektroforetycznych dowodzi, iż prążki $O_{2.1}+O_{2.2}+O_{2.4}+O_{2.5}$ tworzące blok *Gli B2-3* w linii kbh-sp2 można obserwować również u siostrzanej linii kbh-sp1 (rys. 3). Prążek $O_{2.3}$ jest identyczny z $O_{1.1}$, natomiast $O_{2.5}$ z jednym z pary prążków niespecyficznych kbh-sp1, których dziedziczenia nie analizowano z uwagi na znaczne podobieństwo do zlokalizowanych w tym samym rejonie obrazu elektroforetycznego prążków rodzaju LAD 480. Istotną różnicę między dwoma biotypami orkiszu można natomiast obserwować w dolnej strefie β -gliadyn i dotyczy ona prążka $O_{2.6}$ linii kbh-sp2, który jest usytuowany pośrodku w stosunku do dwóch prążków kbh-sp2: prążka $O_{1.2}$ i bezpośrednio położonego nad nim jednego z pary prążków niespecyficznych.



Rys. 3. Zróżnicowanie frakcji β gliadyn w liniach orkisz (kbh-sp1 i kbh-sp2) użytych jako komponenty rodzicielskie do krzyżowań z rodem LAD 480 i odmianą Flair
 Fig. 3. Differentiation of β gliadins in two spelt biotypes: kbh-sp1 and kbh-sp2 used as parental components in cross combinations with strain LAD 480 and cultivar Flair



Rys. 4. Schemat bloków białek gliadynowych kodowanych chromosomami 6B (z lewej strony) oraz 6D (z prawej strony). Bezpośrednio obok skali R_m przedstawiono schemat obrazu elektroforetycznego odmiany Begra

Fig. 4. Schemes of gliadin protein blocks coded by chromosomes 6B (left) and 6D (right). Nearby the scale of R_m values diagram of protein pattern of cv. Begra is presented

Dla wszystkich frakcji wchodzących w skład opisanych bloków obliczono wartości wskaźnika R_m , których zadaniem jest ułatwienie ich identyfikacji w przyszłych badaniach. Dodatkowo wskaźnik ten informuje o wzajemnej lokalizacji różnych prążków na obrazie elektroforetycznym (tab. 6). Uzyskane wartości R_m umożliwiły przedstawienie opisanych bloków w postaci graficznej i umieszczenie ich w katalogu (rys. 4). W przypadku prążków $O_{1.1}$ i $L_{1.1}$, dla których nie wykazano, iż są one allelicznymi wariantami jednego genu, lecz

które również zamieszczono w katalogu, pozostawiono oznaczenia identyczne, jak dla frakcji białkowych.

Tabela 6

Wartości wskaźnika R_m prążków elektroforetycznych wchodzących w skład bloków gliadyn kodowanych chromosomami 6B i 6D

R_m values of electrophoretic bands composing gliadin blocks coded by chromosomes 6B and 6D

Locus	Numer bloku gliadyn Number of gliadin block	Numer prążka Number of band	Symbol prążka Symbol of band	R_m
<i>Gli B2</i>	1	1	O _{1,2}	1,45
	2	1	L _{1,1}	1,27
		2	L _{1,2}	1,5
	3	1	O _{2,1}	1,09
		2	O _{2,2}	1,12
		3	O _{2,4}	1,3
		4	O _{2,5}	1,34
	4	1	F _{2,2}	1,33
		2	F _{2,3}	1,39
	<i>Gli D2</i>	1	O _{1,1}	1,24
		1	L _{1,1}	1,27
	1	1	O _{2,3}	1,25
		2	O _{2,6}	1,44
	2	1	F _{2,1}	1,27
		2	F _{2,3}	1,42

DYSKUSJA

Analiza dziedziczenia białek z grupy β -gliadyn u mieszańców F_2 dwóch kombinacji krzyżowań pozwoliła zidentyfikować sześć bloków: cztery z grupy chromosomu 6B i dwa z grupy chromosomu 6D. Uzyskane wyniki dają odpowiedź na pytania formułowane we wstępie. Frakcje gliadynowe wchodzące w skład bloków *Gli B2*: 1, 2, 3 i 4 oraz *Gli D2*: 1 i 2 są allelicznymi wariantami białkowymi genów zlokalizowanych na krótszych ramionach chromosomów 6B i 6D. Z kolei pary bloków *Gli B2*-3/*Gli D2*-3 oraz *Gli B2*-4/*Gli D2*-4 są kodowane genami zlokalizowanymi na różnych chromosomach i dziedziczą się w sposób niezależny.

Cztery spośród sześciu opisanych bloków stanowią grupy składające się z dwóch prążków, w drugim przypadku zidentyfikowano grupę utworzoną z czterech prążków, w jednym przypadku blokiem okazała się pojedyncza frakcja białkowa. Bloki opisane w katalogu Metakovsky'ego składają się na ogół z większej liczby prążków (od dwóch do ośmiu) aniżeli w niniejszej pracy (Metakovsky, 1991). W grupie chromosomu 6B zdecydowana ich większość zawiera prążki zarówno w strefie β jak i γ gliadyn (analogicznie jak *Gli B2*-3 w linii kbh-sp2). Z kolei bloki z grupy chromosomu 6D zlokalizowane są głównie w strefie β obrazu elektroforetycznego oraz w strefie α , gdzie nakładają się na prążki kodowane chromosomem 6A. Identyfikacja analogicznych frakcji w polskich materiałach hodowlanych będzie wymagać w przyszłości doboru kompo-

mentów rodzicielskich zawierających mniejszą liczbę bardziej zróżnicowanych prążków w strefie α -gliadyn.

Interpretacja dwóch niespecyficznych β -gliadyn, obecnych zarówno w linii kbh-sp1, jak i u rodu LAD 480 również wymaga dodatkowych badań. Uzyskane wyniki sugerują, że mogą one wchodzić zarówno w skład bloków kodowanych chromosomem 6B jak i 6D bądź też obu bloków jednocześnie. Bezpośrednie porównanie obrazów elektroforetycznych biotypów orkiszu częściowo wyjaśnia problem ich klasyfikacji. Zaobserwowane podobieństwa β -gliadyn sugerują, iż poza prążkiem O_{1.2} blok kodowany chromosomem 6B w linii kbh-sp1 może składać się również z prążków tworzących blok *Gli B2-3* linii kbh-sp2. Biorąc pod uwagę ogólne podobieństwo β -gliadyn obu linii, hipoteza taka wydaje się prawdopodobna. W konsekwencji różnicę pomiędzy biotypami orkiszu można interpretować jako efekt genetycznego różnicowania jednego z alleli wielokrotnych należących do serii kodowanej chromosomem 6B. Jedną z możliwych przyczyn takiego różnicowania jest proces rekombinacji wewnątrzgenowej, w wyniku którego silne sprzężenie genów gliadyn w obrębie jednego locus ulega rozerwaniu. Proces taki został opisany w literaturze (Pogna i in., 1993). W efekcie można obserwować nowe kombinacje białek nieznacznie różniące się od bloku z którego powstały. Dalszą konsekwencją różnicowania jest powstanie całej rodziny podobnych bloków, których obecność u odmian i rodów pszenicy przemawia za ich bliskim pokrewieństwem (Metakovsky i in., 1986). Prawdopodobnie taki mechanizm zróżnicował gliadyny obu badanych linii orkiszu.

Identyfikacja bloków w strefie β -gliadyn pozwoliła zmodyfikować opracowany wcześniej katalog, który nie uwzględniał bloków kodowanych chromosomami 6B i 6D, a jedynie wprowadzał podział obserwowanych frakcji na podstrefy. Uzyskane wyniki będą stanowić punkt wyjścia dla identyfikacji kolejnych, nierzadko wysoce specyficznych, wariantów białkowych obserwowanych w materiałach hodowlanych wytwarzanych przez polskich hodowców.

LITERATURA

- Bushuk W., Zillman R. R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can J. Plant Sci.* 58: 505 — 515.
- Brzeziński W. 2003. Katalog elektroforetyczny zarejestrowanych w Polsce odmian pszenicy, pszenżyta, jęczmienia i owsa. *Wiadomości Odmianoznawcze, COBORU, Słupia Wielka*, z. 78: 21 — 45.
- Mc Intosh R. A. 1983. A catalogue of gene symbols for wheat. *Proc. 6th Intern. Wheat Genetics Symp. Kyoto, Japan*: 1197 — 1284.
- Metakovsky E. V. 1991. Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. Breed.* 45: 325 — 344.
- Metakovsky E. V., Akhmedov M. G., Sozinov A. A. 1986. Genetic analysis of gliadin-encoding genes reveals gene cluster as well as single remote genes. *Theor. Appl. Genet.* 73: 278 — 285.
- Payne P. I., Harris P. A., Law C. N., Holt L. M., Blackman J. A. 1980. The high-molecular-weight subunits of glutenin: structure, genetics and relationships to bread-making quality. *Ann. Technol. Agric.* 29: 309 — 320.
- 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. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 304: 259 — 371.
- Pogna N. E., Metakovsky E. V., Redaelli R., Raineri F., Dachkevitch T. 1993. Recombination mapping of Gli-5, a new gliadin-coding locus on chromosomes 1A and 1B in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87: 113 — 121.
- Sozinov A. A. 1987. Blocks of cereal storage proteins as genetic markers. Vavilov Institute of General Genetics, USSR Academy of Science, Moscow.
- 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. 1997. Polimorfizm białek gliadynowych i gluteninowych a jakość pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.). *Biul. IHAR* 204: 205 — 218.
- Waga J. 2000. Syntetyczna metoda klasyfikacji białek gliadynowych. *Biul. IHAR* 215: 35 — 60.