

Sprawozdanie merytoryczne z realizacji zadania nr 1 na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2015 roku

„Badania nad efektywnością markerów funkcjonalnych w powiązaniu z analizą reologiczną w mikroskali dla oceny cech jakościowych pszenicy zwyczajnej”

Zadanie badawcze finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Nr decyzji: HOR hn 801-PB-22/15, poz. nr 1.

Kierownik zadania: prof. dr hab. inż. Bolesław Salmanowicz

Zgodnie z harmonogramem realizowano równoległe cztery tematy badawcze.

Celem prac realizowanych w temacie 1 było oszacowanie efektywności rozdziału LMW podjednostek gluteninowych pszenicy uzyskiwanych przy zastosowaniu nowoczesnych metod tj. wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej. W równoległe realizowanym temacie 2 przeprowadzona została wstępna ocena wpływu obecności funkcjonalnego allelu *Gpc-B1* kontrolującego zawartość białka w ziarnie na cechy jakościowe ziarna pszenicy zwyczajnej. W ramach tematu nr 3 zweryfikowano poprawność identyfikacji alleli locus *Glu-D3* kodujących LMW podjednostki gluteninowe w ziarniakach pszenicy w oparciu o odmiany wzorcowe przy zastosowaniu markerów molekularnych oraz przeprowadzono analizy molekularne badanego materiału roślinnego celem określenia składu LMW-GS kodowanych przez allele tego locus w 60 krajowych odmianach pszenicy zwyczajnej. Celem badawczym tematu 4-ego było przeprowadzenie oceny wpływu składu LMW białek gluteninowych na cechy jakościowe pszenicy o zidentyfikowanych wariantach allelicznych genów loci *Glu-1* i *Glu-3* kodujących poszczególne białka gluteninowe w ziarnie pozyskanym z doświadczeń polowych z kolejnego roku hodowli.

1. Opracowanie metodyki rozdziału i identyfikacji LMW podjednostek gluteninowych oraz przeprowadzenie oceny tej klasy białek w ziarnie odmian krajowych pszenicy przy zastosowaniu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami.

Wysokocząsteczkowe podjednostki gluteninowe wraz z LMW-GS w znacznym stopniu wpływają (do 70%) na jakość technologiczną pszenicy. Ze względu na występowanie dużego polimorfizmu w obrębie LMW-GS (dotychczas wyróżniono ponad 45 alleli w loci *Glu-A3*, *Glu-B3* i *Glu-D3*) oraz częste powinowactwo do białek gliadynowych, LMW podjednostki gluteninowe są słabo poznane, a dokładna charakterystyka poszczególnych podjednostek białkowych i wpływ na jakość końcową pszenicy jest wciąż obiektem wielu badań. Metoda RP-HPLC jest powszechnie stosowana do rozdziału i charakterystyki m.in. białek zapasowych zbóż.

Materiał badawczy i metody. Obiektem badań było 21 odmian wzorcowych pszenicy zawierających dotychczas opisane w literaturze allele trzech loci (*Glu-A3*, *Glu-B3* i *Glu-D3*) genów kodujących LMW podjednostki gluteninowe. W dalszym etapie badań identyfikowano LMW podjednostki gluteninowe występujące w ziarnie 32 krajowych odmian pszenicy zwyczajnej.

Frację LMW-GS pozyskiwano z mąki w/w prób na drodze ekstrakcji kolejno: wydzielenia albumin i globulin buforem fosforanowym (0,4M NaCl + 0,067 M HKNaPO₄), białek gliadynowych 70% alkoholem etylowym, a następnie białek gluteninowych (HMW i LMW-GS) buforem 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) zawierającym 50% 1-propanol, 2M mocznik oraz 1% DTT. Analizy RP-HPLC przeprowadzono na aparacie Beckman-Coulter (USA) wyposażonym w zestaw pomp H126, detektor diodowy i oprogramowanie Karate wersja 8.1. Do rozdziału białek stosowano wysokosprawne kolumny chromatograficzne typu Jupiter C18 oraz Phenomenex 250 C18, 300Å o wymiarach 250x4,1 mm oraz 150x2,0 mm. Podczas optymalizacji

rozdziálu LMW-GS techniką RP-HPLC stosowano gradient rozpuszczalników rozdzielających [woda z TFA (A) - acetonitryl z TFA (B)] w zakresie 15-85% acetonitrylu. Rozdziały białek przeprowadzono w zakresie temperatur 40-60⁰ C, przy pomiarze absorpcji światła w 210, 214 i 280 nm.

Wyniki. Na podstawie znajomości składu jakościowego LMW-GS odmian wzorcowych na chromatogramach zidentyfikowano poszczególne piki białkowe (2-5 izoform dla każdej z podjednostek) przypisując im wyznaczone czasy retencji. Na chromatogramach obserwowano 1-2 dodatkowe izoformy LMW-GS kodowane przez locus *Glu-B3* w porównaniu z liczbą izoform występujących na profilach CZE. Zestawy pików białkowych LMW-GS kodowanych przez allele locus *Glu-D3* składały się w trzech pików. Na RP-HPLC chromatogramach piki odpowiadające poszczególnym LMW-GS miały czasy retencji w zakresie od 39,53 min do 50,46 min. Przeprowadzona analiza porównawcza czasów retencji pików białkowych uzyskanych dla analizowanych 32 odmian pszenicy z czasami uzyskanymi dla odmian wzorcowych wykazała zgodność identyfikacyjną z danymi uzyskanymi przy zastosowaniu wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej w przypadku 31 badanych odmian. Różnicę stwierdzono jedynie w identyfikacji alleli locus *Glu-B3* odmiany Mulan, gdzie w miejsce wcześniej zidentyfikowanego allelu b stwierdzono obecność allelu d. Podobnie jak w przypadku elektroforezy kapilarnej w badanym materiale zidentyfikowano występowanie 11 wariantów allelicznych loci *Glu-3*.

2. Charakterystyka wstępna genotypów pszenicy zawierających allel funkcjonalny genu *Gpc-B1* kontrolujący zawartość białka w ziarnie pszenicy w powiązaniu z analizą reologiczną w mikroskali

Zawartość białka w ziarnie (GPC) pszenicy jest cechą krytyczną, która określa żywieniową wartość, przetwórcze własności i w wielu krajach również cenę rynkową ziarna. Prowadzona w ostatnich dziesięcioleciach na szeroką skalę selekcja ukierunkowana na poprawę plonu pszenicy spowodowała częściową utratę tej własności, co jest wynikiem dobrze udokumentowanej ujemnej korelacji między plonem a GPC. Badania porównawcze odmian pszenicy z różnych okresów uprawy wykazują, że nowoczesne odmiany mają zredukowane GPC w porównaniu do odmian starszych. Genowa introgresja funkcjonalnych alleli genów *Gpc-B1* i *Gpc-B2* z dzikiej pszenicy płaskurki (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) rozszerzyły genetyczną różnorodność tej cechy dostarczając nowych możliwości dla wzrostu GPC w ziarnie pszenicy. Materiał badawczy i metody. Ustabilizowane genetycznie linie pszenicy, pochodzące z cyklu krzyżowań ze źródłem genu *Gpc-B1*, zasiano wiosną 2015 roku na mikroplotkach w celu rozmnożenia materiału oraz przeprowadzenia charakterystyki najważniejszych cech rolniczych (wysokość roślin, wczesność, porażenie przez podstawowe choroby zbóż, stopień wylegania). Do badań zebrano materiał roślinny w postaci ziarna obejmujący 58 linii pszenicy.

Obecność translokacji zawierającej gen *Gpc-B1* w wyhodowanych liniach pszenicy potwierdzono za pomocą reakcji PCR przy użyciu trzech markerów molekularnych. Podstawowe parametry jakościowe mąki (ogólna zawartość białka, wilgotność, zawartość glutenu, wodochłonność) oznaczono na spektrofotometrze DA7200 f-my Perten techniką NIR w zakresie fal 950-1700 nm. Mąkę do badań reologicznych pozyskano mieląc ziarno w czterowalcowym młynie laboratoryjnych Quadromat Junior firmy Bradenber. Pomiar reologiczny mąki pszennej przeprowadzono w mikroskali z zastosowaniem miksografu oraz analizatora tekstury z przystawką Kieffera.

Wyniki. Po dopracowaniu warunków reakcji PCR dla odmian wzorcowych uzyskano produkty amplifikacji zgodne z danymi literaturowymi dla zastosowanych markerów. Obecność genu *Gpc-B1* stwierdzono w 23 próbach. W celu określenia wpływu obecności genu *Gpc-B1* na wartość

wypiekową badanych genotypów na wstępie oznaczono podstawowe parametry jakościowe mąki (ogólna zawartość białka, wilgotność, zawartość glutenu, wodochłonność), następnie przeprowadzono analizy reologiczne ciasta w mikroskali. Średnia wartość białka ogólnego w badanej mące wahała się od 11,24 % do 16,28 %. Zawartość glutenu kształtowała się w szerokim zakresie od 18,65 % do 33,92 %. Podwyższoną zawartość białka powyżej 14,5% stwierdzono w 23 badanych próbach, z których 16 zawierało gen *Gpc-B1*. Badania reologiczne ciasta pozyskanego z 58 genotypów przeprowadzono w mikroskali przy zastosowaniu 10-g miksografu oraz analizatora tekstury z przystawką Kieffera. Wyróżniono 24 linie o wysokim miksograficznym indeksie jakości (powyżej 19 jednostek), z których 22 zawierało gen *Gpc-B1*. Analizy wykonane na analizatorze tekstury wykazały, że linie zawierające gen *Gpc-B1* charakteryzowały się wyższą siłą ciasta, rozciągliwością oraz pracą włożoną w rozciąganie.

3. Weryfikacja AS-PCR i STS markerów molekularnych identyfikujących geny loci *Glu-D3* kodujących LMW podjednostki gluteninowe w ziarniakach pszenicy w oparciu o 15 odmian wzorcowych i 60 odmianach krajowych

Materiał i metody. Dla 15 odmian wzorcowych pszenicy oraz 60 badanych krajowych odmian wyizolowano genomowi DNA metodą Dorokhova. Identyfikacje alleli loci *Glu-D3* przeprowadzano za pomocą reakcji PCR przy użyciu 4 zestawów starterów allelospecyficznych.

Wyniki. Użyte zestawy starterów po dopracowaniu warunków amplifikacji w przypadku odmian wzorcowych dawały produkty o wielkości bp zgodnie z danymi literaturowymi. Podczas analiz 42 odmian pszenicy otrzymano produkty amplifikacji wielkości 773 pz lub 388 pz potwierdzające obecność allelu *Glu-D3c*, który identyfikowano za pomocą dwóch par starterów *gluD3c* i *gluD3ceki*. Jednocześnie zastosowanie markera *gluD3ceki* umożliwiło identyfikację allelu *Glu-D3e*, który stwierdzono w 11 odmianach. Analizy PCR przeprowadzone z markerem *gluD3abdgi* dodatkowo potwierdziły obecność alleli: *Glu-D3a* w 7 odmianach. Zastosowane markery molekularne w pełni potwierdziły poprawność identyfikacji wariantów allelicznych genów loci *Glu-D3* zidentyfikowanych wcześniej przy pomocy wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej.

4. Określenia wpływu składu LMW białek gluteninowych na cechy jakościowe odmian pszenicy z kolejnego roku doświadczeń polowych za pomocą metod biochemicznych i reologicznych (tekstuometr i miksograf)

Na cechy jakościowe pszenicy w znacznym stopniu wpływa zawartość białka występująca w ziarnie, a w szczególności skład jakościowo-ilościowy białek zapasowych tj. wysoko- i niskoząsteczkowych glutenin (HMW- i LMW-GS) oraz gliadyn. Wiedza na temat wpływu poszczególnych HMW-GS na cechy technologiczne jest dobrze poznana, natomiast w przypadku wpływu LMW-GS brak dotychczas jednoznacznych danych.

Materiały i metody. Obiektem badań było 61 odmian pszenicy o oznaczonym wcześniej składzie HMW-GS w ziarnie. Analizy biochemiczne mąki przeprowadzano po 14 dniach leżakownia mąki na aparacie Spektrofotometr NIR 7200 firmy Perten techniką NIR w zakresie światła: 950-1700 nm celem określenia podstawowych własności fizykochemicznych badanych mąk (wilgotność, ogólną zawartość białka, zawartość glutenu, wodochłonność). Uzyskaną mąkę poddano badaniom reologicznym w mikroskali na 10g-miksografie (oznaczenie pięciu charakterystycznych parametrów reologicznych ściśle skorelowanych z określonymi cechami jakościowymi pszenicy) oraz analizatorze tekstury TA.XT z przystawką Kieffera (oznaczenie siły, wydłużenia ciasta, oraz elastyczności).

Wyniki. W wyniku przeprowadzonej analizy wydzielonej frakcji LMW podjednostek gluteninowych metodą wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej w badanym materiale

potwierdzono występowanie 11 wariantów allelicznych loci *Glu-3*. Stwierdzono występowanie po 3 alleli w genomach A i D oraz 6 w genomie B. W badanych odmianach występowały najczęściej warianty alleliczne *Glu-A3e/Glu-B3b/Glu-D3c* (11 odmian) oraz *Glu-A3f/Glu-B3e/Glu-D3c* (10 odmian). Przeprowadzona analiza porównawcza uzyskanych danych przy zastosowaniu 10g-miksografu umożliwiła stwierdzenie istotnych różnic we właściwościach reologicznych uzyskanych w zależności od występowania w próbce wariantu allelicznego loci *Glu-3*. Wykazano, że w obrębie loci *Glu-3* na maksymalny czas rozwoju korzystnie wpływała obecność alleli *Glu-A3f*, *Glu-A3d*, *Glu-D3b*, *Glu-D3a*, na maksymalną szerokość krzywej obecność alleli *Glu-A3e*, *Glu-A3f*, *Glu-D3a*, *Glu-D3c*, a na maksymalną wysokość krzywej allele *Glu-A3b*, *Glu-A3e*, *Glu-D3c*, *Glu-D3a*. Na wszystkie parametry fazy rozwoju ciasta pozytywnie wpływają LMW-GS kodowane przez allele *Glu-B3h* oraz *Glu-B3i*, natomiast negatywnie kodowane przez allele *Glu-B3b* oraz *Glu-B3c*. Najwyższy średni miksograficzny indeks jakości wykazywały odmiany posiadające warianty alleliczne *GluA3f/Glu-B3d/Glu-D3c*, *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3a* oraz *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c*. Najniższym średnim indeksem charakteryzowały się natomiast odmiany, w których występował wariant *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3e*. Na podstawie danych uzyskanych przy zastosowaniu analizatora tekstury metodą Kieffera stwierdzono wzrost siły ciasta w ziarnie zawierającym LMW-GS kodowanych przez allel *Glu-A3d*, *Glu-A3f*, *Glu-B3b*, *Glu-B3h*, *Glu-D3a* i *Glu-D3c* oraz osłabienie siły w przypadku występowania allelu *Glu-A3e*. Najkorzystniejsze parametry reologiczne, świadczące o dobrej jakości wypiekowej pszenicy, posiadały odmiany zawierające warianty allelicznych *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c*, *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c* oraz *Glu-A3f/Glu-B3e/Glu-D3c*. Podobnie jak w przypadku analiz miksograficznych w obrębie wyróżnionych grup pszenic o określonym składzie jakościowym LMW-GS obserwowano znaczne różnice w wartościach parametrów reologicznych dla poszczególnych odmian.

Wnioski

1. Zastosowanie nowoczesnych metod analitycznych wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami umożliwia pełną identyfikację LMW-GS kodowanych przez allele loci *Glu-3*.
2. Zastosowane markery PCR potwierdziły poprawność identyfikacji alleli w obrębie loci *Glu-A3*, *Glu-B3* oraz *Glu-D3*.
3. Uzyskane dane wskazują, że w ujęciu jednostkowym genotypy pszenicy posiadające LMW-GS kodowanych przez allele *Glu-A3b*, *Glu-B3d*, *Glu-D3a*, charakteryzują się najkorzystniejszymi parametrami reologicznymi (wysoki mikrograficzny indeks jakości oraz wysoka siła/wytrzymałość ciasta przy odpowiedniej rozciągliwości).
4. Wykazano znaczny wpływ poszczególnych wariantów allelicznych LMW-GS na jakość technologiczną pszenicy; szczególnie pozytywny wpływ stwierdzono w przypadku występowania w ziarniakach pszenicy zwyczajnej wariantów allelicznych *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c*, *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3a* oraz *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c*.