

Rozprawa doktorska pt.

## **Identyfikacja czynników genetycznych warunkujących twardość ziarna w materiałach hodowlanych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)**

**mgr Mateusz PRZYBOROWSKI**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie  
Zakład Genomiki Funkcjonalnej

o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie agronomia

Promotor: prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk

Promotor pomocniczy: dr Sebastian Gasparis

### **STRESZCZENIE**

Twardość ziarna pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zależy głównie od zmienności w genach kodujących puroindoliny (*Pina-D1* i *Pinb-D1*), które zlokalizowane są na krótkim ramieniu chromosomu 5D. Cecha ta ma bezpośredni wpływ na właściwości technologiczne mąki i jakość produktu końcowego. Głównym celem badań była kompleksowa analiza czynników determinujących twardość ziarna odmian i linii hodowlanych pszenicy stosowanych w polskiej hodowli. Praca została zrealizowana w trzech częściach: 1) analiza częstości mutacji w obu genach *Pin* i ich wpływu na twardość ziarna w 118 współczesnych odmianach i liniach hodowlanych pszenicy uprawianych w Polsce oraz 80 polskich odmianach miejscowych; 2) opracowanie szybkiej i skutecznej metody identyfikacji alleli genu *Pinb*; 3) identyfikacja nowych potencjalnych czynników transkrypcyjnych (TF) związanych z określeniem twardości ziarniaków pszenicy.

Stwierdzono, że we wszystkich analizowanych odmianach hodowlanych, liniach hodowlanych i odmianach miejscowych allel *Pina-D1a* był typu dzikiego. Zmienność alleliczna została zaobserwowana w genie *Pinb*. Najczęściej występującym allelem we współczesnych odmianach i liniach hodowlanych pszenicy (ponad 50%) był *Pinb-D1b*. Udział pozostałych alleli (*Pinb-D1a*, *Pinb-D1c* i *Pinb-D1d*) był znacznie niższy (po ok. 15%). W odmianach miejscowych najczęściej występującym allelem był *Pinb-D1a* (w ponad 70%), a następnie *Pinb-D1b* (częstość 21%). *Pinb-D1c* i *Pinb-D1g* zidentyfikowano w pojedynczych odmianach. Analiza SKCS wykazała, że twardość ziarna była powiązana ze zmiennością alleliczną genu *Pinb* u większości badanych odmian. Średnie wartości twardości ziarna były istotnie większe u odmian ze zmutowanymi wariantami genu *Pinb* w porównaniu do odmian z allelem *Pinb-D1a*.

W oparciu o wykryte polimorfizmy pojedynczego nukleotydu przetestowaliśmy różne metody badania przesiewowego mutacji, takie jak: markery polimorfizmu sekwencji powielonej i pociętej (CAPS), wysokorozdzielcza krzywa topnienia produktu reakcji łańcuchowej polimerazy (HRM-PCR), allelospecyficzny, multipleksowy PCR (MASA-PCR) i identyfikacja mutacji za pomocą enzymu CEL I. Stwierdzono, że najbardziej wartościowymi metodami są MASA-PCR i CEL I. Pierwsza z nich jest testem prostym i szybkim, ale jego możliwości wykrywania ograniczyły się tylko do trzech mutacji genu *Pinb* występujących w polskiej populacji pszenicy. Metoda CEL I pozwala na wykrycie dowolnej mutacji w genie *Pinb*, ale procedura jest bardzo czasochłonna i niestety wymaga wcześniejszej ekstrakcji enzymu z selera zwyczajnego (*Apium graveolens* L.) ponieważ nie jest on dostępny komercyjnie.

Na podstawie analizy bioinformatycznej sekwencji promotorowej genów *Pin* wybrano 26 TF potencjalnie wpływających na ekspresję genu *Pina* i 16 TF potencjalnie wpływających na ekspresję genu *Pinb*. Analiza RNAseq, którą wykonano dla jednej odmiany w dwóch punktach czasowych, 14 i 20 dni po pyleniu (DAP) wykazała, że z pośród wytypowanych TF w analizie bioinformatycznej, 25 ulegało ekspresji w dojrzewających ziarniakach. Określono również wzory ekspresji genów *Pin* i wybranych TF w trzech punktach czasowych (14, 20 i 26 DAP) w 16 odmianach i liniach hodowlanych, które wykazywały różne poziomy twardości

ziarna pomimo posiadania tych samych alleli genów *Pin*. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów i analiz statystycznych zidentyfikowaliśmy 5 TF mających prawdopodobny wpływ na ekspresję genów *Pin*. Konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia związku wybranych TF z sekwencją promotorową genów *Pin*.

Doctoral thesis entitled:

**Identification of genetic factors determining grain hardness  
in breeding materials of common wheat (*Triticum aestivum* L.)**

**SUMMARY**

Wheat (*Triticum aestivum* L.) grain hardness is determined mainly by variations in puroindoline genes (*Pina-D1* and *Pinb-D1*), which are located on the short arm of chromosome 5D. This trait has a direct effect on technological properties of the flour and final product quality. The main objective of the study was a comprehensive analysis of factors determining grain hardness in cultivars and breeding lines used in Polish breeding. The work was accomplished in three parts: 1) Analysis of the mutation frequency in both *Pin* genes and their influence on grain hardness in 118 modern bread wheat cultivars and breeding lines cultivated in Poland, and 80 Polish landraces; 2) development of a fast and effective method for identification of *Pin* gene alleles; 3) identification of new potential transcription factors (TFs) involved in determination of the hardness of wheat kernels.

All analyzed cultivars, breeding lines, and landraces possess the wild-type *Pina-D1a* allele. Allelic variation was observed within the *Pinb* gene. The most frequently occurring allele in modern wheat cultivars and breeding lines (over 50%) was *Pinb-D1b*. The contribution of the remaining alleles (*Pinb-D1a*, *Pinb-D1c*, and *Pinb-D1d*) was much less (approx. 15% each). In landraces, the most frequent allele was wild-type *Pinb-D1a* (over 70%), followed by *Pinb-D1b* (21% frequency). *Pinb-D1c* and *Pinb-D1g* were found in individual varieties. SKCS analysis revealed that grain hardness was strictly connected with allelic variation of *Pinb* gene in most tested cultivars. The mean grain hardness values were significantly greater in cultivars with mutant *Pinb* variants as compared to those with the wild-type *Pinb-D1a* allele.

Based on the detected single-nucleotide polymorphisms we tested different methods of mutation screening, such as: cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers, High Resolution Melting-PCR (HRM-PCR), multiplex allele-specific amplification-PCR (MASA-PCR) and identification of mutations by enzyme CEL I. MASA-PCR and CEL I were found to be the most valuable methods. MASA-PCR appeared to be the fastest and least problematic but its detection capabilities were limited to determination of only three *Pinb* gene mutations occurring in the Polish wheat population. CEL I method allows for detection of any mutation in the *Pinb* gene, but procedure is a very time-consuming and unfortunately it requires prior extraction of the enzyme from celery (*Apium graveolens* L.), which is not commercially available.

Based on bioinformatic analysis of the promoter sequence of *Pin* genes, 26 transcription factors potentially affecting *Pina* gene expression and 16 transcription factors potentially affecting *Pinb* gene expression were selected. RNAseq analysis, which was performed for one cultivar at two time points - 14 and 20 days after pollination (DAP) showed that of the TFs selected by bioinformatic analysis, 25 were expressed in maturing seeds. Expression patterns of *Pin* genes and the selected TFs at three time points (14, 20 and 26 DAP) in 16 cultivars and breeding lines, which showed different grain hardness levels despite possessing the same alleles of *Pin* genes, were presented. Based on performed experiments and statistical analyses we identified 5 TF that have influence on expression of *Pin* genes. Further studies are necessary to confirm the association of selected TFs with the promoter sequence of *Pin* genes.

