



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
Państwowy Instytut Badawczy

Mateusz Przyborowski

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

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

Praca doktorska

wykonana w Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej

pod kierunkiem

promotora prof. dr hab. Anny Nadolskiej – Orczyk

oraz

promotora pomocniczego dr inż. Sebastiana Gasparisa

Badania finansowane w ramach:

**Programu Wieloletniego 2015-2020 zadanie 2.1**

*Cel szczegółowy 5. Poszerzenie puli genetycznej pszenicy o formy o różnej twardości ziarna oraz dostarczenia hodowcom wybranych genotypów do hodowli.*

**Dotacji dla młodych naukowców 2018**

*Poszukiwanie nowych, potencjalnych czynników transkrypcyjnych białek zapasowych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) i potwierdzenie ich ekspresji w dojrzewających ziarniakach.*

Badania zostały częściowo opublikowane:

Przyborowski, M., Gasparis, S., Kała, M., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A, 2020. *The variability of puroindoline-encoding alleles and their influence on grain hardness in modern wheat cultivars cultivated in Poland, breeding lines and Polish old landraces (*Triticum aestivum* L.).* Agronomy, 10(8), 1075.

oraz we wniosku patentowym:

Przyborowski M., Nadolska-Orczyk A.,2020. *Test molekularny zawierający zestaw starterów do jednoczesnej identyfikacji trzech alleli genu Pinb.* Zgłoszenie nr P.435854. Data zgłoszenia do UP RP: 30.10.2020

## Wprowadzenie:

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) jest jedną z najważniejszych roślin zbożowych, która stanowi źródło pokarmu dla około 40% populacji światowej oraz jest wykorzystywana jako składnik paszy dla zwierząt.

Twardość ziarna pszenicy zwyczajnej jest jedną z najważniejszych cech technologicznych, determinującą jakość przemiału oraz wpływającą na końcową jakość technologiczną mąki (Igrejas i in., 2001; Li i in., 2014; Ribeiro i in., 2017). Prace badawcze nad twardością ziarna pszenicy prowadzone są od lat 60 XX w. Początkowo były to prace związane z dziedziczeniem tej cechy i weryfikacją, że jest to cecha determinowana przez pojedynczy *locus* (Symes, 1965). Następnie *locus* ten został zlokalizowany w genomie pszenicy (Law i in., 1978) oraz zidentyfikowano białka, których obecność wpływała na zmniejszenie twardości ziarna pszenicy (Greenwell i Schofield, 1986). Przełomowe okazały się prace Giroux i Morris (1998), w których dowiedziono, że cecha ta jest warunkowana przez dwa geny *Pina* oraz *Pinb*. Oba geny *Pin* nie zawierają intronów, a długość ich sekwencji kodującej wynosi 447 pz. Geny te znajdują się w *locus Ha*, który zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 5D (Gautier i in., 1994). Obydwa geny *Pin* występują jedynie w subgenomie D; brak ich homeologów w subgenomach A i B. Prawdopodobną przyczyną może być delecja fragmentów chromosomów, która nastąpiła w toku ewolucji praprzodków pszenicy zwyczajnej w czasie poliploidyzacji (Chantret i in., 2005). Allele typu dzikiego odpowiednio: *Pina-D1a* oraz *Pinb-D1a* warunkują powstanie fenotypowo miękkiego ziarna. Z kolei jakakolwiek mutacja w jednym lub obu genach *Pin*, powodująca zamianę w sekwencji aminokwasowej prowadzi do powstania fenotypu o twardym ziarnie (Giroux i Morris, 1998). *Pina* i *Pinb* kodują białka puroindolinowe, odpowiednio puroindolinę A (PINA) oraz puroindolinę B (PINB). Zróżnicowanie sekwencji w obrębie dwóch genów *Pin* jest bardzo duże. Do tej pory w różnych odmianach pszenicy zwyczajnej jak również tak zwanych odmianach pszenicy syntetycznej (ang. *synthetic wheat*) oraz formach uzyskanych na drodze mutagenyzy chemicznej opisano 30 allelicznych wariantów genu *Pina*, wliczając warianty delecyjne oraz 33 warianty genu *Pinb* (Iftikhar i Ali, 2017; Kammeraad i in., 2016; Kumar i in., 2015; Li i in., 2020; Morris i in., 2020; Nadolska-Orczyk i in., 2009). W większości przypadków różnice pomiędzy allelami wynikają z polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP).

Do innych czynników mogących mieć niewielki wpływ na twardość ziarna pszenicy zalicza się: zawartość białka całkowitego (Turnbull i Rahman, 2022), białka glutenowe (Quayson i in., 2018), czy też zawartość arabinoksylianów i arabinogalaktaów (Lillemo i in., 2002). Jedynym opisanym do tej pory czynnikiem transkrypcyjnym, który został bezpośrednio powiązany z twardością

ziarniaków pszenicy zwyczajnej jest czynnik transkrypcyjny SPA (ang. *Storage Protein Activator*) (Ravel i in., 2009).

Ze względu na fakt, że twardość ziarna pszenicy zwyczajnej jest ważną cechą technologiczną, metody, które są wykorzystywane do pomiarów tej cechy są ciągle doskonalone. Metody pomiaru twardości możemy podzielić na dwie zasadnicze grupy ze względu na ich specyfikę, tj. grupę pomiarów technologicznych oraz wytrzymałościowych (Frączek i in., 2003). Trzema najczęściej stosowanymi metodami są: PSI (ang. *Particle Size Index*), NIR (spetroskopia bliskiej podczerwieni, ang. *Near Infrared Reflectance*) oraz SKCS (ang. *Single Kernel Characterization System*). Najszerzej stosowaną jest metoda SKCS (Martin i in. 1993; Pearson i in., 2007), skomercjalizowana przez firmę Perten Instruments.

## **Cel pracy:**

Głównym celem pracy była kompleksowa analiza czynników warunkujących twardość ziarna pszenicy w odmianach i liniach hodowlanych wykorzystywanych w polskiej hodowli. Praca realizowana była w trzech etapach:

1. Poznanie zróżnicowania allelicznego genów *Pin* w pszenicach wykorzystywanych w polskiej hodowli i uprawie.
2. Opracowanie szybkiej i skutecznej metody oznaczania alleli genów *Pin* występujących w polskiej uprawie oraz hodowli pszenicy.
3. Poznanie innych czynników genetycznych (czynniki transkrypcyjne) i fenotypowych, które mają wpływ na kształtowanie twardości ziarniaków pszenicy zwyczajnej.

## **Wyniki badań:**

### **1. Analiza polskiej populacji pszenicy zwyczajnej**

#### **1.1 Zmienność genów *Pin***

Zmienność alleliczną genów *Pin* analizowano w oparciu o sekwencjonowanie amplikonów metodą Sangera. Materiał roślinny stanowiły 62 współczesne odmiany hodowlane, 51 linie hodowlane dostarczone przez hodowców z Hodowli Roślin Strzelce, Hodowli Roślin Smolice oraz Danko Hodowla Roślin jak również 80 Polskich odmian miejscowych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) pozyskanych z Krajowego Centrum Roślinnych Zasób Genowych. We wszystkich analizowanych współczesnych odmianach, liniach hodowlanych oraz odmianach

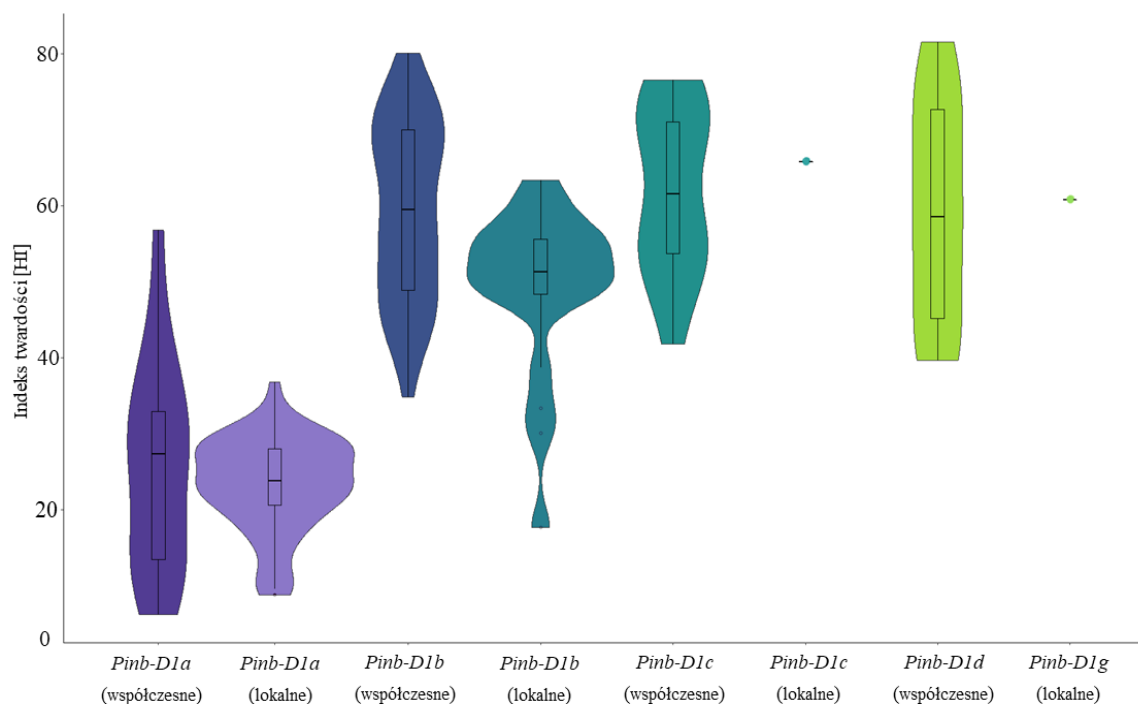
lokalnych występował tylko allel typu dzikiego genu *Pina*, czyli *Pina-D1a*. W przypadku genu *Pinb* zmienność alleliczna była większa, ale ograniczona jedynie do pięciu alleli. W przypadku odmian i linii współczesnych najczęściej występującym allelem był *Pinb-D1b*, który zidentyfikowano w 67 genotypach, co stanowi 57% badanej grupy. Allel typu dzikiego *Pinb-D1a* występował w 19 (16%) odmianach i liniach hodowlanych, allel *Pinb-D1d* w 18 (15%), natomiast najmniej licznie występował allel *Pinb-D1c*, który wykryto w 14 (12 %) współczesnych odmianach i liniach pszenicy. W przypadku odmian lokalnych proporcja zmienności była zupełnie inna w porównaniu do współczesnych przedstawicieli pszenicy zwyczajnej. Najliczniej reprezentowanym allelem był allel *Pinb-D1a*, który został oznaczony w 57 (71%) odmianach. W 21 (26%) odmianach występował allel *Pinb-D1b*. Pojedynczy przypadek stanowił allel *Pinb-D1c* oraz unikalny dla Europejskich populacji pszenicy zwyczajnej allel *Pinb-D1g*.

## 1.2 Twardość ziarna

Twardość ziarna mierzono metodą SKCS. We współczesnych odmianach i liniach hodowlanych indeks twardości (HI) dla każdego allelu miał następujący rozkład: dla *Pinb-D1a* od 6 do 57; dla *Pinb-D1b* od 35 do 80; dla *Pinb-D1c*, od 42 do 77; dla *Pinb-D1d* od 40 do 82. W odmianach lokalnych indeks twardości dla grupy *Pinb-D1a* wynosił od 9 do 37, a dla *Pinb-D1b* od 18 do 63. Dla genotypów z allelem *Pinb-D1c* HI wynosił 66, a z allelem *Pinb-D1g* był równy 61 (Rys. 1). Szczegółowe zestawienie twardości dla poszczególnych alleli zostało zamieszczone w załączniku w tabeli S1 oraz S2. Poszczególne genotypy zaklasyfikowano na podstawie twardości ziarna zgodnie z systemem zaproponowanym przez Corona i in. (2001) do trzech kategorii. W przypadku współczesnych odmian i linii hodowlanych do kategorii miękkich pszenic zostało zaklasyfikowanych 20 genotypów, 74 do pszenic średnio twardych oraz 24 do pszenic twardych. W odniesieniu do odmian lokalnych 61 pszenic zostało zaklasyfikowanych jako pszenice miękkie, a 19 jako pszenice średnio twarde.

## 1.3 Zawartości białka, skrobi oraz glutenu w ziarniakach odmian lokalnych

Zawartość białka, skrobi oraz glutenu była mierzona metodą NIR. Analizy zostały wykonane w ziarniakach 80 odmian lokalnych. Zawartość białka w badanych odmianach wynosiła od 13,10% do 23,15%. Zawartość skrobi oznaczono w przedziale od 55,85% do 67,70%, a zawartość mokrego glutenu od 28,05% do 53,15%.



**Rysunek 1** Zakresy indeksów twardości dla poszczególnych alleli *Pinb* z podziałem na współczesne pszenice oraz odmiany lokalne. Szerokości figur na wykresie określają częstotliwość występowania danego indeksu twardości w pszenicach (za Przyborowski i in., 2020).

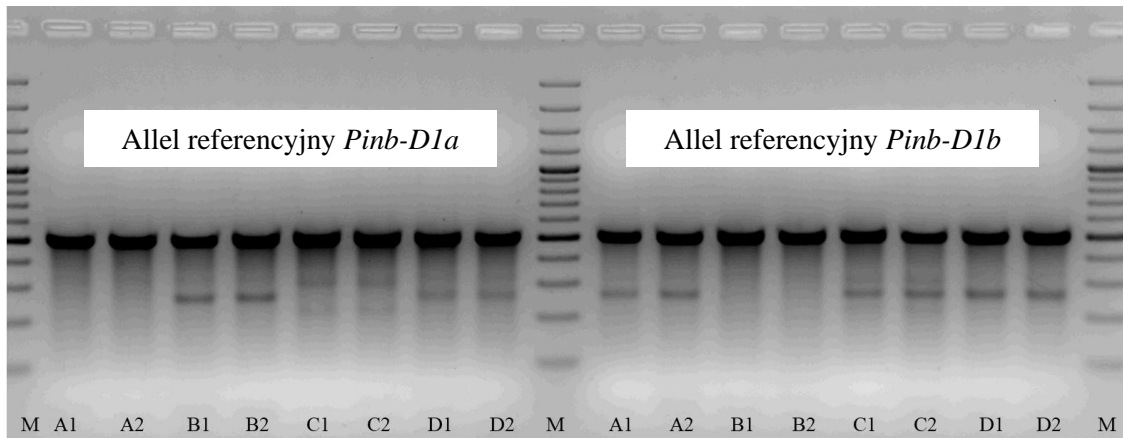
## 2. Różne metody identyfikacji alleli genu *Pinb*

W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki detekcji alleli genu *Pinb* metodami alternatywnymi w stosunku do sekwencjonowania, które mogą mieć zastosowanie w pracach hodowlanych. Sekwencjonowanie Sangera stanowiło metodę referencyjną dla analizowanych technik. W każdej poniżej opisanej metodzie zostały zastosowane te same odmiany z wcześniej oznaczonymi allelami metodą Sangera. Dla poszczególnych reakcji matrycę stanowiło gDNA wyizolowane z różnych odmian pszenicy, odpowiednio: Slade (*Pinb-D1a*); Anthus (*Pinb-D1b*), Piko (*Pinb-D1c*) i Artis (*Pinb-D1d*).

### 2.1. Trawienie enzymatyczne przy użyciu endonukleazy CEL I

Wzór fragmentów ampliconu genu *Pinb* po trawieniu enzymatycznym endonukleazą CEL I przedstawiono na rysunku 2. Jeżeli testowana odmiana miała inny allel niż allel referencyjny to otrzymany na żelu wzór składał się z co najmniej trzech prążków, tj. nierozciętego ampliconu (zarówno allele badane jak i referencyjne) oraz przynajmniej dwóch fragmentów, których długość

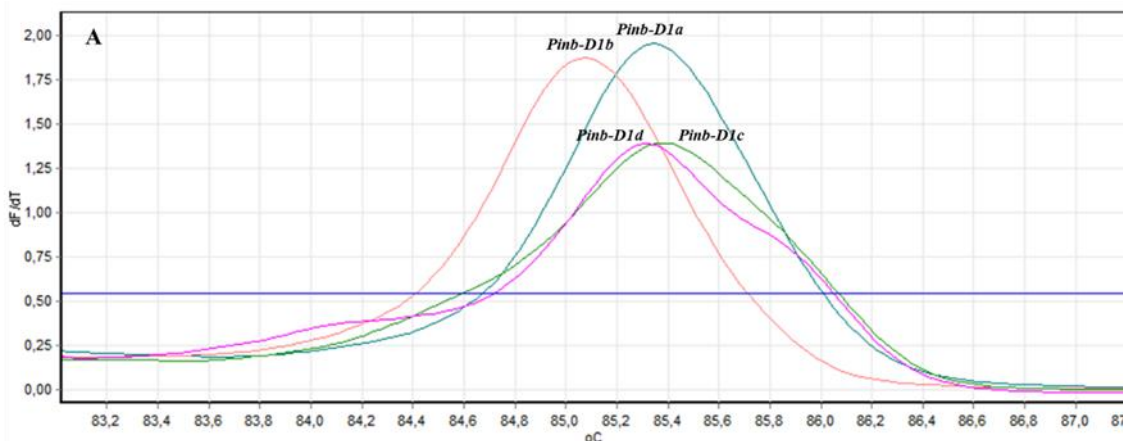
zależała od miejsca występowania niesparowanych nukleotydów w heteroduplexie allelu referencyjnego i badanego (Rys. 2.)

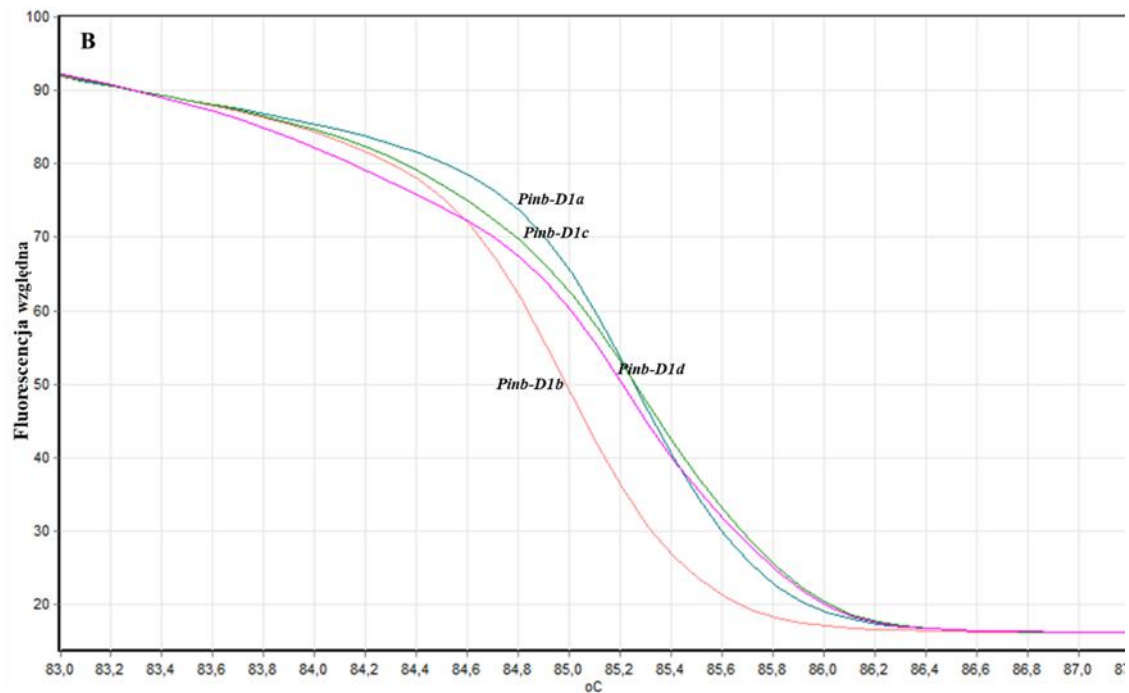


**Rysunek 2** Wzory fragmentów ampliconu genu *Pinb* po trawieniu CEL I w żelu agarozowym. M – marker wielkości, A1 i A2 – mieszanina ampliconów referencyjnych oraz ampliconów *Pinb-D1a*, B1 i B2 – z *Pinb-D1b*, C1 i C2 – z *Pinb-D1c*, D1 i D2 – z *Pinb-D1d*.

## 2.2. Wysokorozdzielcza krzywa topnienia produktu reakcji łańcuchowej polimerazy (HRM-PCR)

W metodzie tej allele genu *Pinb* amplifikowano w reakcji łańcuchowej polimerazy, której końcowym etapem było wyznaczenie krzywych topnienia produktów amplifikacji z jednoczesnym pomiarem fluorescencji. Na rysunku 3 przedstawiono wykres zaniku fluorescencji (znormalizowanej względem przyrostu kopii ampliconów w czasie PCR) wraz z przyrostem temperatury. Wynik z trzech powtórzeń technicznych dla każdego allelu został uśredniony i przedstawiony w formie jednej krzywej. Maksimum fluorescencji ( $dF/dT$ ) dla poszczególnych alleli genów *Pinb* było obserwowane odpowiednio: dla allelu *Pinb-D1a* w  $85,35\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,02\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), dla allelu *Pinb-D1b* w  $85,07\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,02\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), dla *Pinb-D1c* w  $85,38\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,03\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) oraz dla *Pinb-D1d* w  $85,32\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,02\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Rys. 3A).

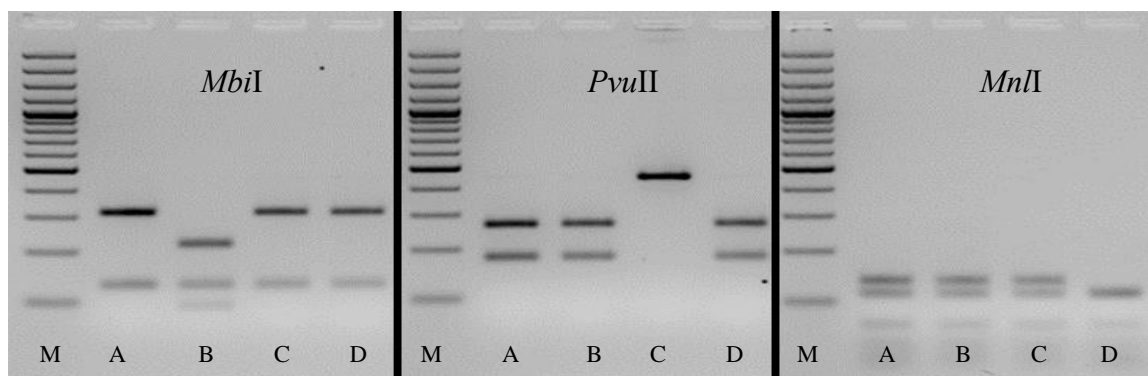




**Rysunek 3** Krzywe topnienia produktów reakcji PCR-HRM dla wybranych alleli genów *Pinb* (A). Znormalizowany wykres różnicujący produkty reakcji PCR-HRM dla alleli genów *Pinb* (B).

### 2.3. Markery molekularne typu CAPS

Wyniki analizy z użyciem markerów CAPS przedstawiono na rysunku 4. Amplikony alleli *Pinb-D1a*, *Pinb-D1c* i *Pinb-D1d*, trawione enzymem *Mbi*I, rozcinane były na dwa fragmenty, które miały długość 318 i 129 pz. Amplikon allelu *Pinb-D1b* trawiony tym samym enzymem, rozcinany był na trzy fragmenty, o długości 223, 129 i 95 pz. Amplikony alleli *Pinb-D1a*, *Pinb-D1b* i *Pinb-D1d* trawione enzymem *Pvu*II rozcinane były na dwa fragmenty o długości 264 i 183 pz, a amplikon allelu *Pinb-D1c* nie był trawiony tym enzymem. Amplikony allelu *Pinb-D1a*, *Pinb-D1b* i *Pinb-D1c* trawione enzymem *Mn*III rozcinane były na dziewięć fragmentów, które miały następujące długości: 137, 112, 66, 45, 29, 25, 20, 5 i 3 pz (widoczne tylko 3 najdłuższe fragmenty). W wyniku trawienia tym samym enzymem amplikonu allelu *Pinb-D1d* uzyskano dziesięć fragmentów o następujących długościach: 115, 112, 66, 45, 45, 29, 25, 22, 20, 5 i 3 pz. Na żelu widoczne są tylko dłuższe fragmenty; fragmenty krótsze (poniżej ~45 pz) nie są widoczne. Reasumując, testowane markery CAPS pozwalają na jednoznaczną identyfikację alleli *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* i *Pinb-D1d*.



**Rysunek 4** Elektroforeza zamplifikowanych fragmentów zawierających gen *Pinb* po trawieniu enzymami restrykcyjnymi. M - marker wielkości 100 bp Plus; A – *Pinb-D1a*; B – *Pinb-D1b*; C – *Pinb-D1c*; D – *Pinb-D1d*.

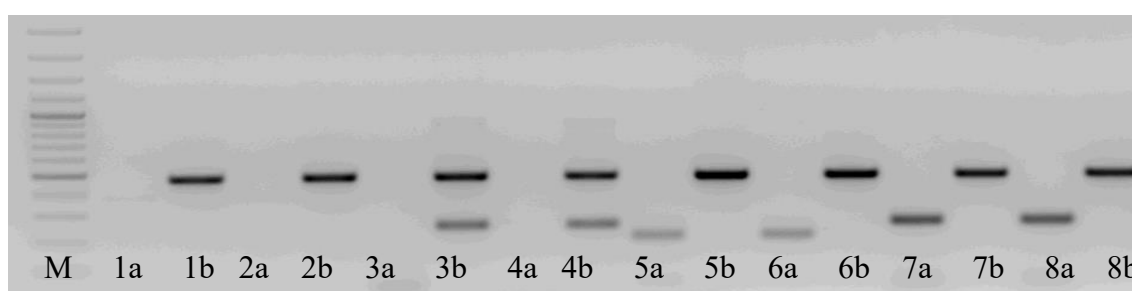


## 2.4. Allelospecyficzny, multipleksowy PCR

Zastosowanie specyficznych starterów sensownych (Pinb\_SNP\_Bm\_F – specyficzny dla allelu *Pinb-D1b*, Pinb\_SNP\_Cm3\_F – specyficzny dla allelu *Pinb-D1c*, Pinb\_SNP\_Dm\_F – specyficzny dla allelu *Pinb-D1d*) do jednego z trzech alleli, wspólnego startera antysensownego (Pinb\_SNP\_R) oraz startera sensownego kontrolnego (Pinb\_CI\_F) pozwala na jednoczesne zidentyfikowanie trzech alleli *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* oraz *Pinb-D1d*. Długość fragmentów gDNA dla ampliconów amplifikowanych parą Pinb\_SNP\_Cm3\_F i Pinb\_SNP\_R wynosi 196 pz, dla Pinb\_SNP\_Dm\_F i Pinb\_SNP\_R wynosi 245 pz, dla Pinb\_SNP\_Bm\_F i Pinb\_SNP\_R wynosi 239 pz, a dla Pinb\_CI\_F i Pinb\_SNP\_R 469 pz (Tabela 1)(Rys. 5).

**Tabela 1** Długości amplifikowanych fragmentów DNA dla poszczególnych par starterów wybranych alleli genu *Pinb*.<sup>1</sup> – lub inny allel niż *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* i *Pinb-D1d*.

Allel genu <i>Pinb-D1</i>	Długość ampliconów dla par starterów			
	Pinb_SNP_Bm_F i Pinb_SNP_R	Pinb_SNP_Cm3_F i Pinb_SNP_R	Pinb_SNP_Dm_F i Pinb_SNP_R	Pinb_CI_F i Pinb_SNP_R
<i>Pinb-D1b</i>	239 pz	brak ampliconu	brak ampliconu	469 pz
<i>Pinb-D1c</i>	brak ampliconu	196 pz	brak ampliconu	469 pz
<i>Pinb-D1d</i>	brak ampliconu	brak ampliconu	245 pz	469 pz
<i>Pinb-D1a</i> lub inny allel <sup>1</sup>	brak ampliconu	brak ampliconu	brak ampliconu	469 pz



**Rysunek 5** Obraz po rozdziale elektroforetycznym allelospecyficznego, multipleksowego PCR; a – reakcja I (reakcja ze starterami Pinb\_SNP\_Bm\_F, Pinb\_SNP\_Cm3\_F i Pinb\_SNP\_R.); b – reakcja II (reakcja ze starterami Pinb\_SNP\_Dm\_F, Pinb\_CI\_F i Pinb\_SNP\_R); M – marker wielkości DNA GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1 – Azzerati (*Pinb-D1a*); 2 – Slade (*Pinb-D1a*); 3 – Anthus (*Pinb-D1b*); 4 – Finezja (*Pinb-D1b*); 5 – Ostroga (*Pinb-D1c*); 6 – Piko (*Pinb-D1c*); 7 – Artis (*Pinb-D1d*), 8 – Trend (*Pinb-D1d*).

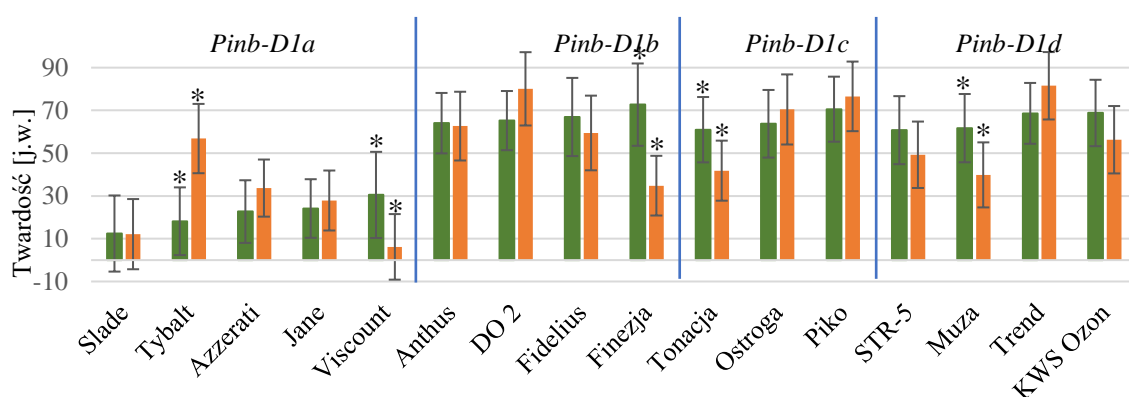
### 3. Poznanie innych czynników genetycznych (czynniki transkrypcyjne) i fenotypowych, które mają wpływ na kształtowanie twardości ziarniaków pszenicy zwyczajnej.

Zaprezentowane wyniki całego spektrum analiz wykonano na szesnastu odmianach lub liniach hodowlanych wybranych na podstawie różnic w twardości ziarna w obrębie tego samego allelu w warunkach polowej uprawy. Wybranymi odmianami dla allelu *Pinb-D1a* były: Slade (HI: 12,14), Tybalt (HI: 56,84), Azzerati (HI: 33,86), Jane (HI: 27,87), Viscount (HI: 6,19); dla allelu *Pinb-D1b*: Anthus (HI: 62,66), DO 2 (HI: 80,09) (linia hodowlana otrzymana z HR Strzelce), Fidelius (HI: 59,45), Finezja (HI: 34,81); dla allelu *Pinb-D1c*: Tonacja (HI: 41,83), Ostroga (HI: 70,45), Piko (HI: 76,57); dla allelu *Pinb-D1d*: STR 5 (HI: 49,25), Muza (HI: 39,85), Trend (HI: 81,52), KWS Ozon (HI: 56,29). Wytypowane odmiany były uprawiane w warunkach ściśle kontrolowanych, tj. w komorze fitotronowej w celu zniwelowania wpływu odporności lub podatności danej odmiany na warunki stresowe (biotyczne i abiotyczne) jakie mogą występować w uprawie polowej.

#### 3.1 Analiza różnic fizjologicznych oraz fenotypowych potencjalnie wpływających na twardość ziarna w wybranych odmianach i liniach pszenicy zwyczajnej

##### 3.1.1 Twardość ziarna wybranych pszenic uprawianych w warunkach fitotronowych i polowych

Twardość ziarna w wytypowanych do przeprowadzenia badań szczegółowych odmianach i liniach hodowlanych podano wyżej. Na rysunku 6 przedstawiono zestawienie indeksu twardości tych pszenic uprawianych w warunkach fitotronowych w porównaniu z warunkami polowymi. Indeks twardości u większości genotypów miał podobne wartości lub nie różnił się istotnie. Natomiast w przypadku pięciu genotypów (Tybalt, Viscount, Finezja, Tonacja i Muza) zaobserwowano istotne statystycznie zmiany.



**Rysunek 6** Zestawienie twardości ziarna pszenicy różnych odmian i linii hodowlanych pochodzących z uprawy fitotronowej (kolor zielony) oraz uprawy polowej (kolor pomarańczowy). \* - różnice istotne statystycznie  $p \leq 0,05$ . Słupki błędu przedstawiają odchylenie standardowe.

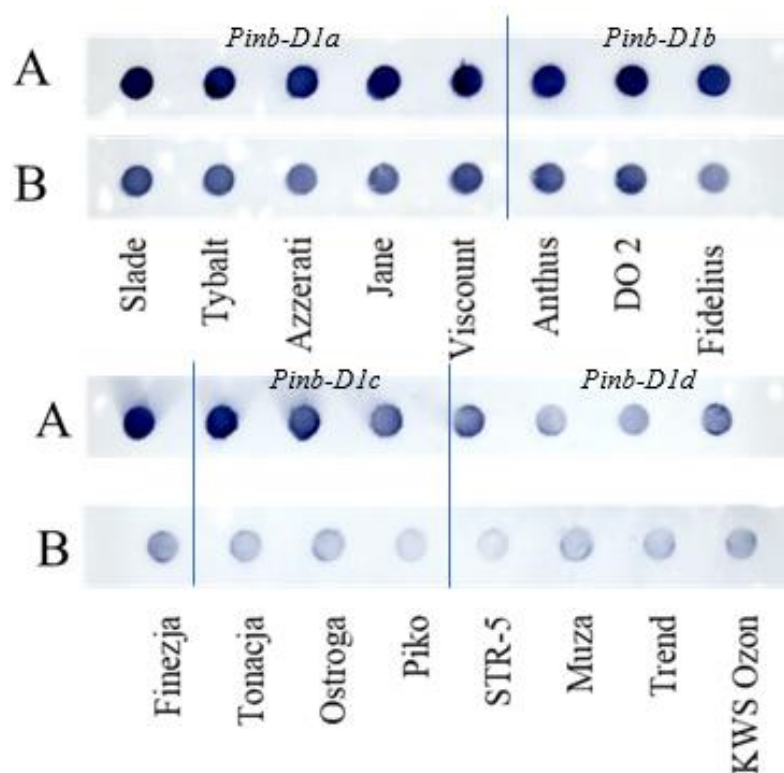
### 3.1.2 Zawartość białka całkowitego w dojrzałych ziarniakach, pomiary wydajności fotosystemu II po adaptacji do ciemności, czas do zakwitnięcia oraz zawartość białek PIN

Procentowa zawartość białka całkowitego oznaczana metodą Kjeldahla w dojrzałych ziarniakach wytypowanych odmian i linii hodowlanych wynosiła średnio 18,75%. Najwyższa procentowa zawartość białka została oznaczona w odmianie Fidelius (22,53%), a najniższa w odmianie Tonacja (15,81%). Pomiar wydajności fotosystemu II (PSII) po adaptacji do ciemności wykonano w trzech punktach czasowych, tj. 14, 20 i 26 DAP. Skupiono się na podstawowych parametrach takich jak: fluorescencja zerowa ( $F_0$ ), fluorescencja maksymalna ( $F_m$ ), fluorescencja zmienna ( $F_v$ ) oraz maksymalna fotochemiczna wydajność PSII ( $F_v/F_m$ ). Charakterystyczną tendencją zaobserwowaną w przypadku fluorescencji zerowej był wzrost wartości odnotowanych parametrów wraz z dojrzewaniem ziarniaków. Jednak w wielu przypadkach, pomimo zauważalnego wzrostu w kolejnych punktach czasowych pomiarów, są to różnice nieistotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ). Średni wzrost wartości  $F_0$  między 14 a 20 DAP wynosił 2,9%, a między 14 a 26 DAP wyniósł 7,8%. Zostały odnotowane istotne statystycznie różnice pomiędzy odmianami oraz liniami hodowlanymi w poszczególnych punktach czasowych. W przypadku większości genotypów nie zaobserwowano związku pomiędzy fluorescencją maksymalną ( $F_m$ ) oraz fluorescencją zmienną ( $F_v$ ) a czasem dojrzewania ziarniaków. Ponadto, w większości przypadków różnice w wartości badanych parametrów pomiędzy poszczególnymi dniami po pyleniu w obrębie jednego genotypu są różnicami nieistotnymi statystycznie. W większości genotypów zauważalne jest nieznaczne zmniejszanie maksymalnej fotochemicznej wydajności PSII ( $F_v/F_m$ ) wraz z dojrzewaniem ziarniaków, jednak najczęściej są to różnice nieistotne statystycznie.

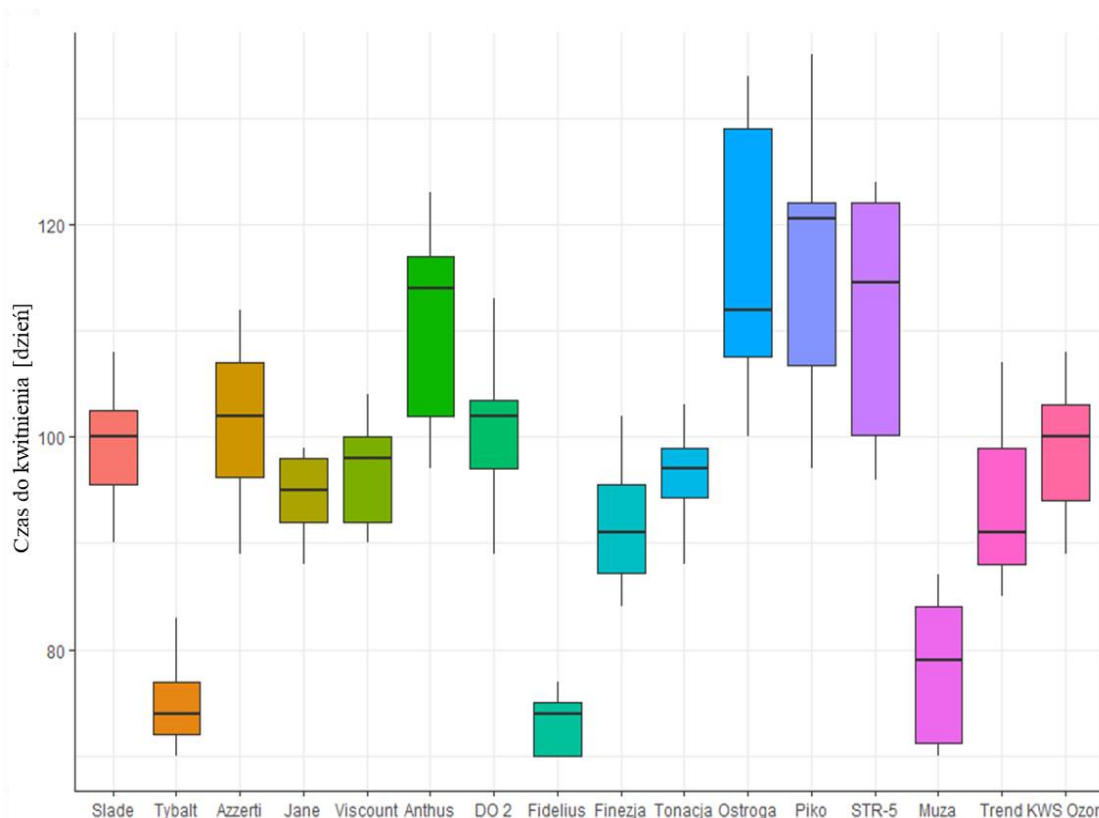
Pomiar zawartości białek PIN oznaczano dwiema metodami tj. SDS-PAGE zgodnie z procedurą ekstrakcji według Bettge i in. (1995) z modyfikacjami wprowadzonymi przez Chang i in. (2006) oraz Dot-blot. Analiza SDS-PAGE wykazała, że dysproporcje w zawartości białek PIN pomiędzy genotypami z allelem dzikim, a genotypami z allelami zmutowanymi genu *Pinb* są bardzo duże. W przypadku miękkich odmian z allelem dzikim genu *Pinb* (Slade, Tybalt, Azzerrati, Jane oraz Viscount) widoczne są duże różnice w zawartości białek PIN. Ze względu na dużą zawartość zarówno białka PINA jak i PINB oraz niewielką różnicę w rozdzielczości tych białek na żelu SDS-PAGE, niezasadne było przeprowadzanie pomiarów densytometrycznych. W przypadku różnic w odmianach i liniach hodowlanych z mutacją w genie *Pinb* zawartość białek PIN jest tak niewielka, że niemożliwa jest wizualna ocena ich zawartości. Drugim sposobem oceny zawartości białek PIN w badanych odmianach i liniach hodowlanych było wykonanie testu Dot-blot. Na rysunku 7 zostały przedstawione reprezentatywne wyniki tego testu. Po pierwsze, zaobserwowano

różnice między intensywnością zabarwienia prób uzyskanych z ekstraktu przygotowanego zgodnie z instrukcją producenta zestawu Durotest S (Rys. 7A) a próbami uzyskanymi po ekstrakcji białek PIN zgodnie z procedurą ekstrakcji według Bettge i in. (1995) z modyfikacjami wprowadzonymi przez Chang i in. (2006) (Rys. 7B). Drugim, bardzo istotnym wynikiem są zdecydowanie mniejsze różnice w intensywności zabarwienia prób między odmianami z allelem typu dzikiego oraz odmianami i linniami hodowlanymi z mutacją w genie *Pinb*, względem analizy SDS-PAGE. Charakterystyczna jest również różnica w intensywności zabarwienia w zależności od sposobu ekstrakcji białka, która jest szczególnie dobrze widoczna w przypadku odmiany Piko oraz linii hodowlanej STR-5.

Na rysunku 8 przedstawiono rozkład czasu do zakwitnięcia (0 DAP) dla wszystkich badanych genotypów. Badane odmiany i linie hodowlane znacząco różniły się czasem zakwitania. Nie zaobserwowano zależności między rodzajem allelu genu *Pinb* a szybkością zakwitania oraz między twardością a szybkością zakwitania.



**Rysunek 7** Skan membrany PVDF wykonanego testu Dot-blot. A– ekstrakt białkowy przygotowany zgodnie z instrukcją producenta zestawu Durotest S; B – ekstrakt białkowy przygotowany zgodnie z procedurą ekstrakcji białek PIN do SDS-PAGE według Chang i in., (2006).



**Rysunek 8** Wykres pudełkowy przedstawiający liczbę dni od wysadzenia roślin do ziemi do zakwitnięcia (0 DAP). Na wykresie przedstawiono wyniki dla pierwszych trzech kłosów w roślinach uprawianych w warunkach fitotronowych w ośmiu powtórzeniach biologicznych.

### 3.2 Analiza różnic genetycznych potencjalnie wpływających na twardość ziarna w wybranych odmianach i liniach pszenicy zwyczajnej

#### Sekwencje fragmentów promotorów genu *Pina* i *Pinb*.

Na podstawie sekwencjonowań metodą Sanger'a nie stwierdzono różnic w obrębie sekwencji promotorowej genu *Pina* o długości 1448 pz, ani w sekwencji promotorowej genu *Pinb* o długości 1501 pz w żadnym spośród szesnastu analizowanych genotypów.

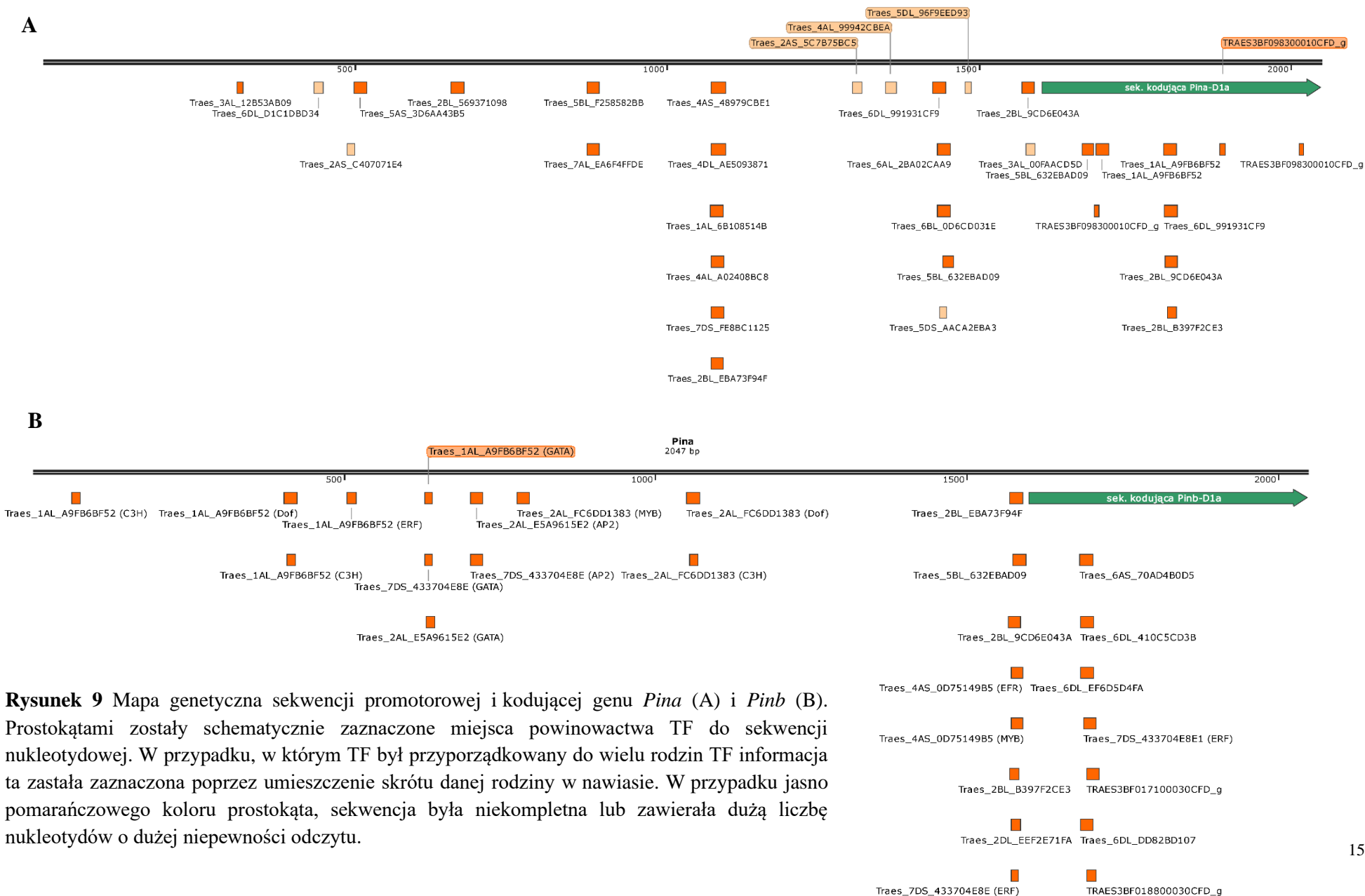
### 3.3 Identyfikacja potencjalnych czynników transkrypcyjnych wpływających na ekspresję genów *Pin*

#### 3.3.1 Analiza *in silico* potencjalnych czynników transkrypcyjnych

Analiza wykonana algorytmem MEME (ang. *Multiple Em for Motif Elicitation*) nie pozwoliła na wykrycie żadnych motywów wiążących czynniki transkrypcyjne (ang. *transcription factors*, TF) w sekwencjach promotorowych, które są istotne statystycznie (wartość E) zarówno dla analizowanych sekwencji genu *Pina* jak i *Pinb*.

Na podstawie analizy algorytmem FIMO (ang. *Find Individual Motif Occurrences*) zostało oznaczonych dwadzieścia sześć czynników transkrypcyjnych potencjalnie wpływających na ekspresję genu *Pina* (Rys. 9A) oraz szesnaście TF potencjalnie wpływających na ekspresję genu *Pinb* (Rys. 9B). Część oznaczonych TF zarówno dla genu *Pina* jak i *Pinb* wykazywała powinowactwo do sekwencji promotorowej w więcej niż jednym miejscu, a niektóre TF zostały przyporządkowane do więcej niż jednej rodziny.

Przyrównano sekwencje nukleotydowe TF zidentyfikowane w analizie FIMO do sekwencji referencyjnej genomu pszenicy zwyczajnej. W wyniku porównania zostało odrzuconych siedem domniemych TF (Traes\_2AS\_5C7B75BC5, Traes\_2AS\_C407071E4, Traes\_3AL\_00FAACD5D, Traes\_4AL\_99942CBEA, Traes\_5DL\_96F9EED93, Traes\_5DS\_AACA2EBA3, Traes\_6DL\_D1C1DBD34 oraz Traes\_2DL\_EEF2E71FA), których sekwencje nie spełniały odpowiednich wymogów dalszej analizy. Następnym etapem było wyszukanie podobnych sekwencji nukleotydowych oraz potencjalne poznanie funkcji genów poprzez homologię w innych gatunkach z rodziny *Poaceae*. Niestety pomimo podobieństwa wynoszącego od 79% do 96% pomiędzy sekwencjami nukleotydowymi wytypowanych TF z sekwencjami zdeponowanymi w bazach genomowych, analizy nie przyniosły spodziewanych rezultatów w postaci opisanych i poznanych genów z innych gatunków roślin zbożowych.



### 3.3.2 Analiza ekspresji genów i potencjalnych czynników transkrypcyjnych

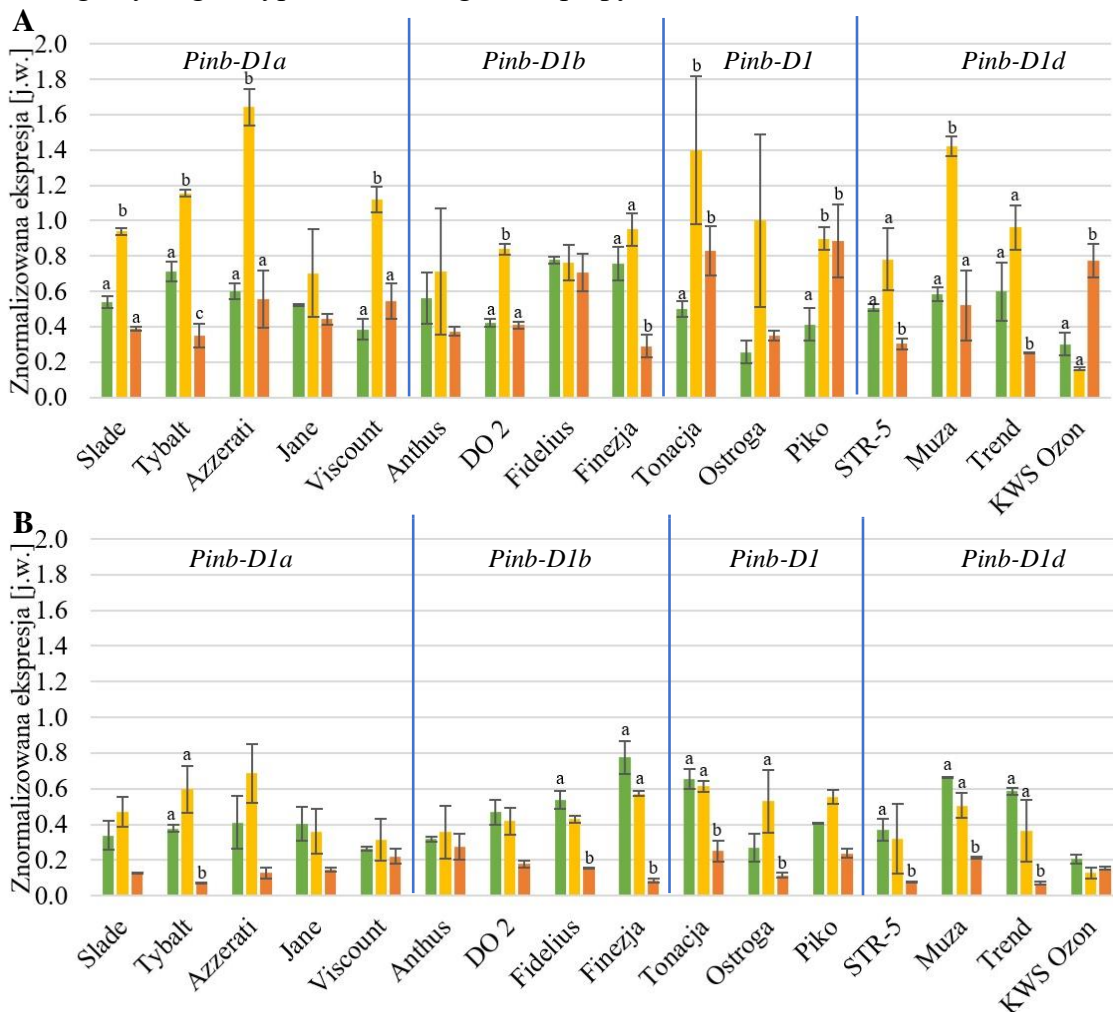
W celu potwierdzenia ekspresji wytypowanych TF w analizie FIMO oraz stwierdzenia, czy występowały różnice w ekspresji pomiędzy stadiami 14 i 20 DAP oraz pomiędzy genami homeologicznymi znajdującymi się na subgenomach A, B i D wykonano analizę RNAseq. Materiał, z którego ekstrahowano RNA stanowiły dojrzewające ziarniaki (14 i 20 DAP) z odmiany Azzerati. W przypadku 4 genów nie odnotowano ekspresji, pozostałe 65 genów ulegało ekspresji zarówno w stadium 14 jak i 20 DAP.

W celu sprawdzenia profili ekspresji wytypowanych TFs w analizie bioinformatycznej oraz analizie RNAseq, oraz ich korelacji z ekspresją genów *Pin* wykonano szereg reakcji qPCR. Zaprojektowano szesnaście par starterów. Zostały wybrane trzy punkty czasowe w rozwoju ziarniaków, odpowiednio 14, 20 i 26 DAP. Kryterium wyboru tych punktów czasowych stanowiły wcześniejsze doniesienia publikacyjne, w których badano profile ekspresji genów *Pin* lub poziom białek PIN (Amoroso i in., 2004; Gasparis i in., 2011; Gautier i in., 1994; Nirmal i in., 2016). Ponadto, została wykonana analiza mająca na celu sprawdzenie poziomu transkryptów w wyżej wymienionych punktach czasowych dla genów *SPA* (ang. *Storage Protein Activator*), których powiązanie z twardością ziarna pszenicy udowodniono we wcześniejszych badaniach (Eagles i in., 2012; Ravel i in., 2009; Yadawad i in., 2018).

W większości analizowanych odmian i linii hodowlanych najwyższa ekspresja genu *Pina* obserwowana była w 20 DAP. Wyjątek stanowiły odmiany o ziarnie twardym Fidelius oraz KWS Ozon. W przypadku odmiany Fidelius poziom ekspresji jest podobny w każdym z obserwowanych punktów czasowych rozwoju ziarna. W przypadku odmiany KWS Ozon 26 DAP był dniem z odnotowaną najwyższą średnią ekspresją genu *Pina*. Warto odnotowana jest również duże zróżnicowanie w poziomie ekspresji genu *Pina* w obrębie analizowanych odmian i linii hodowlanych, niezależnie od występującej mutacji w genie *Pinb* (Rys. 10A). W przypadku genu *Pinb*, nie ma jednego dominującego dnia w rozwoju ziarniaków, w którym średnia ekspresja była najwyższa we wszystkich badanych odmianach. Zostały zaobserwowane dwa dominujące rodzaje wzorów ekspresji: pierwszy, częściej występujący, zaobserwowany w dziewięciu odmianach i liniach hodowlanych, w którym maksymalny poziom ekspresji przypada na 14 DAP i wraz z kolejnymi analizowanymi dniami po pyleniu stopniowo się zmniejsza. Wyjątek stanowi odmiana KWS Ozon, w której drugim punktem czasowym z najwyższą średnią ekspresją jest 26 DAP. Drugi rodzaj wzoru ekspresji, w którym najwyższy średni poziom ekspresji został oznaczony w 20 DAP, a najniższy średni poziom ekspresji został oznaczony w 26 DAP zaobserwowany w siedmiu odmianach (Rys. 10B). Istotnie statystycznie różnice w poziomie ekspresji występowały zarówno



między poszczególnymi dniami po pyleniu w obrębie jednego genotypu, jak również pomiędzy poszczególnymi genotypami dla danego dnia po pyleniu.



**Rysunek 10** Znormalizowany poziom ekspresji genów *Pina* (A) i *Pinb* (B) analizowany w trzech punktach czasowych dojrzewających ziarniaków szesnastu odmian. Kolor zielony – 14 DAP, kolor żółty – 20 DAP, kolor pomarańczowy – 26 DAP. Kolejne litery alfabetu naniesione na wykres odzwierciedlają istotne statystycznie różnice ( $p \leq 0,05$ ) w ekspresji genów *Pin* pomiędzy dniami po pyleniu w obrębie jednej odmiany lub linii hodowlanej. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

Poziom ekspresji analizowanych, potencjalnych TF był zróżnicowany pomiędzy analizowanymi genotypami oraz poszczególnymi badanymi punktami czasowymi. W nielicznych przypadkach zostały zaprojektowane startery umożliwiające rozróżnienie genów homeologicznych. W przypadku jedenastu potencjalnych TF nie sprawdzono ekspresji z powodu braku możliwości zaprojektowania starterów, braku ekspresji tych genów w analizie RNAseq lub powstawaniu wielu niespecyficznych produktów w PCR.

Ostatnią grupą genów, dla których wykonywano analizę wzoru ekspresji były geny *SPA-A*, *SPA-B* oraz *SPA-D*. Wspólną cechą wszystkich trzech analizowanych TF była stosunkowo duża różnica w poziomie ekspresji pomiędzy powtórzeniami biologicznymi. Najwyższą liczbą transkryptów,

spośród analizowanych czynników transkrypcyjnych SPA charakteryzował się gen SPA-A, a najniższą SPA-D.

### 3.4 Korelacje

We wszystkich analizowanych układach, ze względu na brak rozkładu normalnego obu lub jednej analizowanej cechy, została wykonana korelacja rang Spearmana. Analizę rozpoczęto od korelacji twardości ziarna mierzonej metodą SKCS ze znormalizowaną ekspresją genów *Pin* w poszczególnych punktach czasowych, jak również z podziałem na występujący allel *Pinb* oraz bez podziału dla wszystkich analizowanych odmian i linii hodowlanych. W przypadku analizy bez podziału, jedynym istotnie statystycznym wynikiem jest negatywna korelacja znormalizowanej ekspresji genu *Pina* w 20 DAP z twardością i wynosi odpowiednio -0,39. Bardzo silne korelacje negatywne między ekspresją genów *Pina*, a twardością wystąpiły pomiędzy genotypami z allelem *Pinb-D1d* i wynoszą odpowiednio dla: *Pina* w 14 DAP – -0,84; *Pina* w 20 DAP – -0,95, a dla *Pinb* w 14 i 20 DAP – -0,84. Pozytywne, istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) korelacje wystąpiły pomiędzy grupą genotypów z allelem typu dzikiego oraz *Pinb-D1c* w 26 DAP i wyniosły odpowiednio 0,56 oraz 0,52. Dla grupy genotypów z allelem *Pinb-D1b* pozytywną korelację pomiędzy twardością i ekspresją genu *Pinb* odnotowano w 20 DAP i wynosiła 0,65 a negatywną, wynoszącą -0,73 26 DAP.

Kolejnym etapem analizy była korelacja ekspresji genów *Pin* oraz czynników transkrypcyjnych SPA dla analizowanych punktów czasowych. Wszystkie korelacje pomiędzy *Pina* oraz *Pinb* dla poszczególnych punktów czasowych są dodatnie i istotne statystycznie. Najwyższy współczynnik korelacji wynoszący 0,97 został oznaczony w 14 DAP, a najniższy wynoszący 0,78 w 26 DAP. W przypadku czynników transkrypcyjnych SPA wyniki korelacji z genami *Pin* nie są już tak wysokie, nie mniej jednak wszystkie istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) korelacje są dodatnie. Dla genu SPA-A wszystkie oznaczone korelacje są istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) i są w zakresie od 0,36 dla korelacji między ekspresją genu *Pinb* i SPA-A w 14 DAP do 0,55 dla korelacji pomiędzy ekspresją genu *Pinb* i SPA-A w 26 DAP. W przypadku czynnika transkrypcyjnego SPA-B została oznaczona jedna, istotna statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) korelacja z genem *Pina* w 14 DAP i wynosiła 0,51. W przypadku pozostałych punktów czasowych nie było korelacji istotnych statystycznie. Do istotnych statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) zalicza się korelacja pomiędzy genem SPA-D a genem *Pina* w 14 DAP, która wynosi 0,37 oraz w 26 DAP wynoszącą 0,46 oraz genem *Pinb* w 26 DAP wynoszącą 0,45. Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją Traes\_1AL\_A9FB6BF52 oraz ekspresją genu *Pina* we wszystkich analizowanych punktach czasowych. W przypadku pozostałych punktów czasowych korelacja wahała się od 0,47 dla genu *Pina* w 26 DAP do 0,67 w 14 DAP dla genu *Pinb*.

Czynnik transkrypcyjny Traes\_2BL\_EBA73F94F istotnie statystycznie korelował w 14 i 20 DAP zarówno z genem *Pina* (odpowiednio 0,52 i 0,45), jak i *Pinb* (0,45 oraz 0,77). W przypadku czynników transkrypcyjnych Traes\_2BL\_B397F2CE3 i Traes\_5BL\_632EBAD09 odnotowano pojedyncze istotne statystycznie korelacje (Tabela 12). W przypadku korelacji między ekspresją genu *Pina* oraz ekspresją wytypowanych TF, dwoma wyróżniającymi się TF są Traes\_4AL\_A02408BC8 oraz Traes\_7AL\_EA6F4FFDE. Dla tych dwóch TF zostały oznaczone istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) korelacje w przedziale od 0,32 do 0,55 we wszystkich punktach czasowych. Dla Traes\_3AL\_12B53AB09 oznaczono korelację dla dwóch punktów czasowych 14 i 20 DAP równą odpowiednio 0,37 oraz 0,52. Jedynym czynnikiem transkrypcyjnym, którego poziom ekspresji koreluje istotnie statystycznie z poziomem ekspresji genu *Pinb* we wszystkich analizowanych punktach czasowych jest Traes\_4AS\_0D75149B5 i są to korelacje w przedziale od 0,37 do 0,60. Dla dwóch TF: TraesCS2B02G436100 oraz TraesCS2D02G414300 nie zaobserwowano, istotnych statystycznie korelacji. W przypadku TF Traes\_6AS\_70AD4B0D5, Traes\_6DL\_410C5CD3B oraz Traes\_6DL\_DD82BD107 zostały oznaczone istotne statystycznie korelacje w stadium 20 DAP i wynosiły odpowiednio 0,63, 0,52 oraz 0,64.

Wykonano również analizę korelacji rang Spearmana pomiędzy ekspresją genów *Pin* a niektórymi parametrami wydajności fotosystemu II po adaptacji do ciemności ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$  oraz  $F_v/F_m$ ) oraz pomiędzy ekspresją genów *Pin* a zawartością białka całkowitego oznaczoną metodą Kjeldahla, ale nie odnotowano istotnych statystycznie wyników. W przypadku ekspresji genów *Pin* a zawartością całkowitą chlorofili została zaobserwowana istotna statystycznie korelacja pomiędzy ekspresją genu *Pina* a stężeniem chlorofili w 14 DAP, która wynosiła 0,61. W pozostałych punktach czasowych nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji.

## Podsumowanie i wnioski:

- Wśród analizowanych współczesnych odmian i linii hodowlanych oraz odmian miejscowych nie występuje zmienność genetyczna w obrębie genu *Pina*. Wszystkie badane genotypy posiadały allel typu dzikiego, *Pina-D1a*.
- Zmienność genu *Pinb* dla populacji pszenicy zwyczajnej uprawianej i hodowanej w Polsce ograniczona jest jedynie do pięciu alleli. W obrębie współczesnych odmian i linii hodowlanych oznaczono allele: *Pinb-D1a*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* oraz *Pinb-D1d*. W odmianach miejscowych stwierdzono występowanie alleli: *Pinb-D1a*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* oraz unikalnego dla europejskiej populacji pszenicy zwyczajnej *Pinb-D1g*.
- Czynnikiem genetycznym o największym wpływie na twardość ziarna pszenicy jest obecność mutacji w genie *Pinb*.
- Zoptymalizowano metodę genotypowania alleli *Pinb* z wykorzystaniem endonukleazy CEL I, pozwalającą na jednoznaczne oznaczenie dowolnego allelu genu *Pinb*.
- Opracowano metodę allelospecyficznego, multipleksowego PCR. Dzięki tej metodzie możliwe jest oznaczenie trzech alleli z mutacjami występującymi w pszenicy zwyczajnej uprawianej i hodowanej na terenie Polski.
- Została potwierdzona teza o wpływie środowiska na twardość ziarna pszenicy, jednak nie jest to wpływ jednoznaczny i łatwy do przewidzenia, a każdy genotyp reaguje w swoisty sposób.
- Czynnikiem bezpośrednio wpływającym na twardość ziarna pszenicy nie jest sumaryczny poziom ekspresji genów *Pin*, ale wzajemny stosunek ekspresji genu *Pina* do *Pinb* oraz wysoki poziom ekspresji genów *Pin* na wczesnym etapie rozwoju ziarniaka.
- Na twardość ma wpływ nie tylko zawartość białek PIN w ziarniaku, ale przede wszystkim lokalizacja tych białek w bielmie.
- Poziom ekspresji genów *Pin* zależny jest od genotypu, ale nie wynika z różnic w obrębie sekwencji promotorowych genów *Pin*.
- Analiza FIMO pozwoliła na identyfikację potencjalnych TF, których ekspresja była pozytywnie skorelowana z ekspresją genów *Pin*, przy czym ich rola w regulacji ekspresji tych genów wymaga eksperymentalnego potwierdzenia.

## Spis literary:

- Amoroso, M.,** Longobardo, L., Capparelli, R., 2004. Real time RT-PCR and flow cytometry to investigate wheat kernel hardness: role of puroindoline genes and proteins. *Biotechnology Letters* 26, 1731-1737.
- Bettge, A.,** Morris, C., Greenblatt, G., 1995. Assessing genotypic softness in single wheat kernels using starch granule-associated friabilin as a biochemical marker. *Euphytica* 86, 65-72.
- 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.
- Chantret, N.,** Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., Gautier, M. F., Cattolico, L., Beckert, M., Aubourg, S., Weissenbach, J., Caboche, M., Bernard, M., Leroy, P., Chalhou, B., 2005. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *aegilops*). *Plant Cell* 17, 1033-1045, doi:10.1105/tpc.104.029181.
- Corona, V.,** Gazza, L., Boggini, G., Pogna, N. E., 2001. Variation in friabilin composition as determined by A-PAGE fractionation and PCR amplification, and its relationship to grain hardness in bread wheat. *Journal of Cereal Science* 34, 243-250, doi:10.1006/jcrs.2000.0416.
- Eagles, H.,** Cane, K., Appelbee, M., Kuchel, H., Eastwood, R., Martin, P., 2012. The storage protein activator gene Spa-B1 and grain quality traits in southern Australian wheat breeding programs. *Crop and Pasture Science* 63, 311-318.
- Gasparis, S.,** Orczyk, W., Zalewski, W., Nadolska-Orczyk, A., 2011. The RNA-mediated silencing of one of the *Pin* genes in allohexaploid wheat simultaneously decreases the expression of the other, and increases grain hardness. *Journal of experimental botany* 62, 4025-4036.
- Gautier, M. F.,** Aleman, M. E., Guirao, A., Marion, D., Joudrier, P., 1994. *Triticum-Aestivum* Puroindolines, 2 Basic Cystine-Rich Seed Proteins - cDNA Sequence-Analysis and Developmental Gene-Expression. *Plant Molecular Biology* 25, 43-57, doi:Doi 10.1007/Bf00024197.
- Gautier, M. F.,** Aleman, M. E., Guirao, A., Marion, D., Joudrier, P., 1994. *Triticum-Aestivum* Puroindolines, 2 Basic Cystine-Rich Seed Proteins - Cdna Sequence-Analysis and Developmental Gene-Expression. *Plant Molecular Biology* 25, 43-57, doi:Doi 10.1007/Bf00024197.
- Giroux, M. J.,** Morris, C. F., 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6262-6266, doi:DOI 10.1073/pnas.95.11.6262.
- Greenwell, P.,** Schofield, J., 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chemistry* 63, 379-380.
- Iftikhar, A.,** Ali, I., 2017. Kernel softness in wheat is determined by starch granule bound Puroindoline proteins. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 26, 247-262.
- Igrejas, G.,** Gaborit, T., Oury, F. X., Chiron, H., Marion, D., Branlard, G., 2001. Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationship to technological properties in French bread wheats. *Journal of Cereal Science* 34, 37-47, doi:10.1006/jcrs.2000.0381.
- Kammeraad, J. D.,** Giroux, M. J., Hogg, A. C., Martin, J. M., 2016. Mutagenesis-derived puroindoline alleles in *Triticum aestivum* and their impacts on milling and bread quality. *Cereal Chemistry* 93, 201-208.
- Kumar, R.,** Arora, S., Singh, K., Garg, M., 2015. Puroindoline allelic diversity in Indian wheat germplasm and identification of new allelic variants. *Breeding Science* 65, 319-326, doi:10.1270/jsbbs.65.319.
- Law, C.,** Young, C., Brown, J., Snape, J., Worland, A., 1978. The study of grain protein control in wheat using whole chromosome substitution lines. Seed protein improvement by nuclear technique. *Proceedings of the two Research Co-ordination Meetings, Baden, 28 March-1 April 1977 and Vienna, 26-30 September 1977. Aneuploids in wheat protein improvement.*, pp. 483-502.
- Li, X.,** Li, Y., Yu, X., Sun, F., Yang, G., He, G., 2020. Genomics-Enabled Analysis of Puroindoline b2 Genes Identifies New Alleles in Wheat and Related Triticeae Species. *International journal of molecular sciences* 21, 1304.

- Li, Y.,** Mao, X., Wang, Q., Zhang, J., Li, X., Ma, F., Sun, F., Chang, J., Chen, M., Wang, Y., 2014. Overexpression of Puroindoline a gene in transgenic durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum) leads to a medium–hard kernel texture. *Molecular breeding* 33, 545-554.
- Lillemo, M.,** & Ringlund, K., 2002. Impact of puroindoline b alleles on the genetic variation for hardness in soft× hard wheat crosses. *Plant breeding*, 121(3), 210-217.
- Martin, C.,** Rousser, R., Brabec, D., 1993. Development of a single-kernel wheat characterization system. *Transactions of the ASAE* 36, 1399-1404.
- Morris, C. F.,** Kiszonas, A. M., Peden, G. L., 2020. Registration of extra-hard kernel near-isogenic hexaploid wheat genetic stocks lacking puroindoline genes. *Journal of Plant Registrations* 14, 92-95.
- Nadolska-Orczyk, A.,** Gasparis, S., Orczyk, W., 2009. The determinants of grain texture in cereals. *Journal of Applied Genetics* 50, 185-197, doi:Doi 10.1007/Bf03195672.
- Nirmal, R. C.,** Furtado, A., Wrigley, C., Henry, R. J., 2016. Influence of Gene Expression on Hardness in Wheat. *Plos One* 11, doi:ARTN e016474610.1371/journal.pone.0164746.
- Osborne, B.,** Anderssen, R., 2003. Single-kernel characterization principles and applications. *Cereal Chemistry* 80, 613-622.
- Pearson, T.,** Wilson, J., Gwartz, J., Maghirang, E., Dowell, F., McCluskey, P., Bean, S., 2007. Relationship between single wheat kernel particle-size distribution and Perten SKCS 4100 hardness index. *Cereal chemistry* 84, 567-575.
- Przyborowski, M.,** Gasparis, S., Kała, M., Orczyk, W., & Nadolska-Orczyk, A., 2020. The variability of puroindoline-encoding alleles and their influence on grain hardness in modern wheat cultivars cultivated in Poland, breeding lines and Polish old landraces (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 10(8), 1075.
- Przyborowski, M.,** Gasparis, S., Kała, M., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A., 2020. The Variability of Puroindoline-Encoding Alleles and Their Influence on Grain Hardness in Modern Wheat Cultivars Cultivated in Poland, Breeding Lines and Polish Old Landraces (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy* 10, 1075.
- Quayson, E. T.,** Marti, A., Morris, C. F., Marengo, M., Bonomi, F., Seetharaman, K., & Iametti, S., 2018. Structural consequences of the interaction of puroindolines with gluten proteins. *Food chemistry*, 253, 255-261.
- Ravel, C.,** Martre, P., Romeuf, I., Dardevet, M., El-Malki, R., Bordes, J., Duchateau, N., Brunel, D., Balfourier, F., Charmet, G., 2009. Nucleotide Polymorphism in the Wheat Transcriptional Activator Spa Influences Its Pattern of Expression and Has Pleiotropic Effects on Grain Protein Composition, Dough Viscoelasticity, and Grain Hardness. *Plant Physiology* 151, 2133-2144, doi:10.1104/pp.109.146076.
- Ravel, C.,** Martre, P., Romeuf, I., Dardevet, M., El-Malki, R., Bordes, J., Duchateau, N., Brunel, D., Balfourier, F., Charmet, G., 2009. Nucleotide Polymorphism in the Wheat Transcriptional Activator Spa Influences Its Pattern of Expression and Has Pleiotropic Effects on Grain Protein Composition, Dough Viscoelasticity, and Grain Hardness. *Plant Physiology* 151, 2133-2144,
- Ribeiro, M.,** Rodríguez-Quijano, M., Giraldo, P., Pinto, L., Vázquez, J. F., Carrillo, J. M., Igrejas, G., 2017. Effect of allelic variation at glutenin and puroindoline loci on bread-making quality: Favorable combinations occur in less toxic varieties of wheat for celiac patients. *European Food Research and Technology* 243, 743-752.
- Symes, K.,** 1965. The inheritance of grain hardness in wheat as measured by the particle size index. *Australian Journal of Agricultural Research* 16, 113-123.
- Turnbull, K. M.,** & Rahman, S., 2002. Endosperm texture in wheat. *Journal of Cereal Science*, 36(3), 327-337.
- Yadawad, A.,** Naik, V. R., Biradar, S., Desai, S., 2018. Phenotypic and Molecular Characterization of Alleles of Grain Quality Genes in Bread Wheat Genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 88, 1359-1365.