

1BL.1RS i 1AL.1RS. Większość odmian pszenic z chromatyną żytnią odznacza się wysokim potencjałem plonowania i dobrą adaptacją środowiskową [Kumlay i in. 2003]. Niestety, wprowadzenie do genotypu pszenicy chromatyny żyta powoduje również pogorszenie fizykochemicznych właściwości mąki i ciasta [Graybosch 2001]. Identyfikacja genów odpowiedzialnych za biosyntezę białek zapasowych u zbóż ma duże znaczenie w hodowli nowych odmian. Według de Bustos i in. [2001] geny kodujące homologiczne białka zapasowe w pszenicy, życie i jęczmieniu są ortologami i są zlokalizowane na chromosomach należących do jednej grupy homeologicznej. Robin i in. [1998] ustalili związki filogenetyczne pomiędzy *Triticum aestivum*, *Triticum monococcum*, *Triticum timopheevi*, *Triticum turgidum*, *Triticum urartu*, *Aegilops squarrosa* oraz przypuszczalny czas formowania się poszczególnych genomów A, B, D i G i loci kodujących gluteniny.

Zastosowanie markerów molekularnych DNA umożliwiło poznanie nowych loci odpowiedzialnych za syntezę białek zapasowych u zbóż. W ostatnich latach mapy genetyczne pszenicy i żyta zostały uzupełnione wieloma genami [Korzun i in. 1998; Ma i in. 2001]. Wykorzystanie nowych materiałów badawczych umożliwia lokalizację kolejnych genów i pozwala na określenie ich ekspresji w obcym tle genetycznym.

Celem pracy była lokalizacja genów kodujących sekalinę na chromosomach żyta przy pomocy markerów biochemicznych i molekularnych. Wykorzystano w tym celu niebadaną pod tym względem serię linii addycyjnych, wyprowadzonych po raz pierwszy w kraju w oparciu o polskie odmiany oraz linię substytucyjną 1B/1R i formy wyjściowe.

METODY

Przedmiotem pracy była uzyskana w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Lublinie seria linii pszenicy cv. Grana z dodanymi kompletnymi i telocentrycznymi chromosomami żyta cv. Dańkowskie Złote: 1R, 2R, 3R, 3RS, 4R, 5R, 6R, 6RL, 7R oraz linia substytucyjna 1B/1R. Ponadto analizowano formy wyjściowe, tj. cv. Grana, cv. Dańkowskie Złote oraz powstałe w wyniku ich krzyżowania oktoploidalne pszenżyto.

Skład jakościowy wysokocząsteczkowych podjednostek gluteninowych oraz obecność sekalin oznaczono w Laboratorium Elektroforetycznym WIBEX w Poznaniu. Analizy zostały przeprowadzone na 10 ziarniakach z każdej formy. Wzorcem były odmiany heksaploidalnej pszenicy Jubilatka i Begra. Przeprowadzono elektroforezę w obecności sodowego siarczanu dodecyłowego (SDS-PAGE), zgodnie z metodą Laemmli [1970]. Przy określaniu składu glutenin posługiwano się nomenklaturą według Payne i Lawrence [1983].

Do identyfikacji genów kodujących sekaliny wykorzystano reakcję łańcuchową polimerazy (STS-PCR). DNA wszystkich testowanych form izolowano z dwutygodniowych siewek zgodnie z metodą Milligana [1992].

Locus *Sec 1* wykryto przy pomocy zmodyfikowanej metody de Froidmont [1998]. Reakcje wykonywano w 20 µl mieszaniny o następującym składzie: 1 x PCR bufor [75 mmol HCl, pH 8,8 w temperaturze 25°C, 20 mmol (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20], 2,5 mmol MgCl₂, 200 µmol każdego dNTP, po 250 nmol startera SECA2 i SECA3, 0,4 U Taq DNA polimerazy, 150 ng DNA. Matrycą było DNA uzyskane z pojedynczych roślin lub z pięciu roślin połączonych w jedną próbę. Zastosowano dwa startery specyficzne dla wzmocnienia sekwencji genu kodującego ω-sekaliny: SECA2 (5' – GTTTGCTGGGAATTATTTG – 3') i SECA3 (5' – TCCTCATCTTTGTATTTG – 3').

Do wykrycia locus *Sec 2* zastosowano procedurę opisaną przez Lee i in. [1994]. W reakcji wykorzystano 2 startery, specyficzne dla sekwencji genu odpowiedzialnego za syntezę γ-sekalin: R1 (5' – CCCAGCAACAACAACCGTCGATTC – 3') i R2 (5' – GTGGCCACATACCA – 3').

Wielkość amplifikowanych fragmentów określono przy pomocy dwu markerów: pUC Mix Marker (Fermentas, Litwa) i Low DNA Mass Ladder (Gibco-BRL, Niemcy).

WYNIKI

W wyniku licznych badań ustalono, że za biosyntezę glutenin wysokocząsteczkowych w pszenicy odpowiadają loci kompleksowe *Glu A1*, *Glu B1*, *Glu D1* znajdujące się na długich ramionach chromosomów odpowiednio 1A, 1B, 1D [Lawrence, Shepherd 1981]. Na jakość ziarna pszenic chlebowych największy wpływ mają gluteniny wysokocząsteczkowe kodowane przez loci *Glu D1*, a szczególnie podjednostka 5+10 [Lafferty, Lelley 2001].

W obrębie badanych linii addycyjnych 'Grana' – 'Dańkowskie Złote' i substytucyjnej 1B/1R nie obserwowano polimorfizmu w składzie wysokocząsteczkowych podjednostek gluteninowych. We wszystkich testowanych liniach oraz w pszenicy 'Grana' locus *Glu A1* determinował blok N (Null), co oznacza brak podjednostek gluteninowych (tab. 1). Locus *Glu D1* był odpowiedzialny za biosyntezę podjednostek 2+12, a locus *Glu B1* kodował podjednostki 6+8. W linii substytucyjnej 1B/1R nie obserwowano podjednostek kodowanych przez loci *Glu B1*, natomiast na elektroforegramie wyraźnie widoczny był prążek charakterystyczny dla białek żytnich, czyli sekalin. W linii addycyjnej 1R obecne były wszystkie podjednostki występujące w pszenicy 'Grana', tj. N-6+8-2+12 oraz jeden prążek sekalinowy. Również na elektroforegramie linii addycyjnej 2R

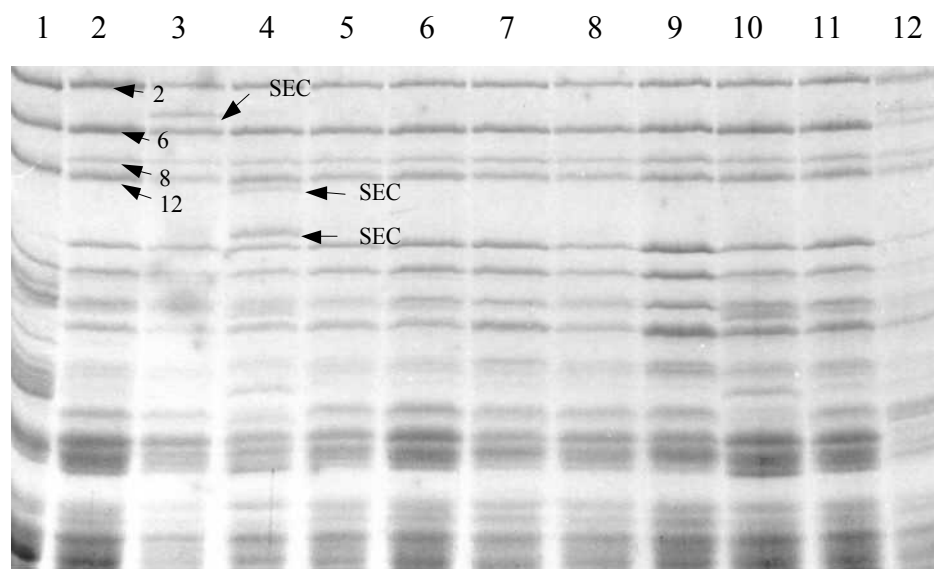
Tabela 1. Skład glutenin wysokocząsteczkowych oraz obecność secalin w liniach addycyjnych, linii substytucyjnej, pszenicy 'Grana' oraz odmianach standardowych
 Table 1. Composition of high molecular weight glutenins and presence of secalins in addition lines, substitution line, 'Grana' wheat and standard varieties

Forma Form	Skład podjednostek kontrolowanych przez loci Composition of subunits controlled by loci			Obecność secalin Presence of secalins
	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	
Linie addycyjne Addition lines				
1R	N	6+8	2+12	+
2R	N	6+8	2+12	+
3R	N	6+8	2+12	
3RS	N	6+8	2+12	
4R	N	6+8	2+12	
5R	N	6+8	2+12	
6R	N	6+8	2+12	
6RL	N	6+8	2+12	
7R	N	6+8	2+12	
Linia substytucyjna Substitution line				
1B/1R	N	-	2+12	+
Formy wyjściowe Initial forms				
Grana	N	6+8	2+12	
Odmiany standardowe Standard varieties				
Jubilatka	2*	6+8	2+12	
Begra	N	7+9	5+10	

obserwowano dwa prążki, świadczące o obecności białek żytnich (ryc. 1). W pozostałych liniach widoczne były tylko prążki odpowiadające podjednostkom gluteninowym.

Z przeprowadzonych analiz wynika, że na chromosomach 1R i 2R w życie 'Dańkowskie Złote' znajdują się geny kontrolujące syntezę secalin. Wyniki te są zgodne z prezentowanymi przez innych autorów. Stwierdzili oni, że chromosom 1R ma trzy loci kodujące białka zapasowe u żyta. Locus *Sec 3*, znajdujący się na długim ramieniu tego chromosomu, odpowiada za biosyntezę secalin wysokocząsteczkowych homologicznych z wysokocząsteczkowymi gluteninami pszenicy [Orellana i in. 1993]. Locus kompleksowy *Sec 1*, warunkujący syntezę secalin typu ω i 40K γ , znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 1R w rejonie satelity [Busch i in. 1995]. Białka kodowane przez *Sec 1* są homologiczne do gliadyn pszenicy. Sprzężenia pomiędzy loci *Sec 3* i *Sec 1* są dobrze poznane [Carrillo i in. 1990]. Trzeci locus *Sec 4* mieści się w pobliżu *Sec 1* i odpowiada za syntezę ω -secalin [Benito i in. 1990]. Na chromosomie 2R zidentyfikowano gen *Sec 2*, który odpowiada za syntezę secalin typu 75K γ , niemających analo-

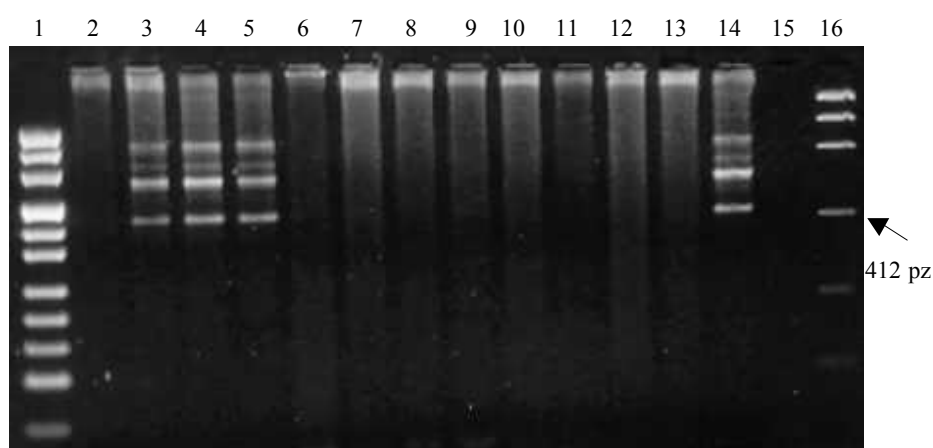
gów w innych zbożach (Sybenga i in. 1991). Badania Malysheva i in. [1998] dowodzą istnienia kolejnego genu *Sec 5* na krótkim ramieniu chromosomu 2R. Geny odpowiadające za syntezę sekalin 75K γ znajdowano także na chromosomie 6R żyta *Secale montanum* [Shewry i in. 1985]. Prawdopodobnie w procesie ewolucji *Secale cereale*, w wyniku translokacji, geny kodujące sekalinę zostały przeniesione z chromosomu 6R *Secale montanum* do chromosomu 2R *Secale cereale*.



Rycina 1. Rozdział elektroforetyczny glutenin wysokocząsteczkowych i sekalin w pszenicy i liniach addycyjnych. Ścieżki: 1 – standard, 2 – pszenica ‘Grana’, 3 – 1R, 4 – 2R, 5 – 3R, 6 – 3RS, 7 – 4R, 8 – 5R, 9 – 6R, 10 – 6RL, 11 – 7R, 12 – standard

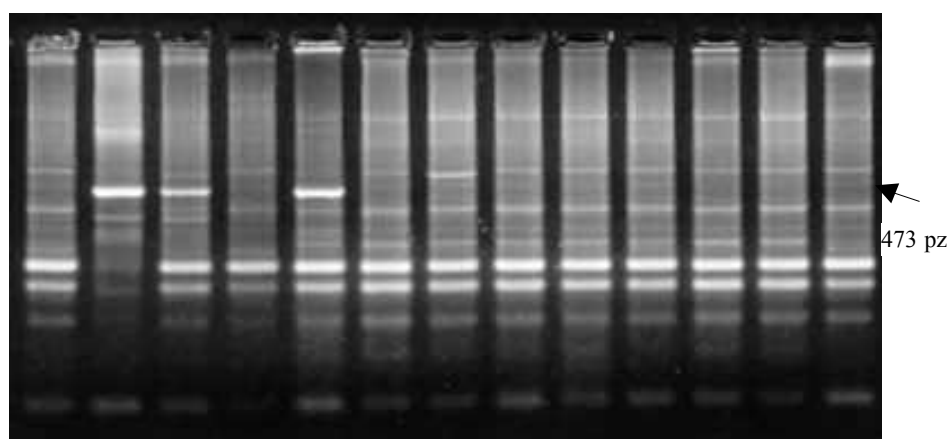
Figure 1. Electrophoretic separation of high molecular weight glutenins and secalins in wheat and addition lines. Lanes: 1 – standard, 2 – ‘Grana’ wheat, 3 – 1R, 4 – 2R, 5 – 3R, 6 – 3RS, 7 – 4R, 8 – 5R, 9 – 6R, 10 – 6RL, 11 – 7R, 12 – standard

Markery molekularne DNA okazały się niezwykle przydatne do wykrywania chromatyny żytniej i lokalizacji genów odpowiedzialnych za biosyntezę sekalin. Włączenie do łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) równocześnie dwóch par starterów specyficznych dla ramion chromosomowych 1BS (O11B3, O11B5) i 1RS (SECA2, SECA3) umożliwia bardzo szybką identyfikację translokacji 1BL.1RS w liniach hodowlanych pszenicy [De Froidmont 1998].



Rycina 2. Produkty PCR uzyskane przy pomocy starterów SECA2 i SECA3. Ścieżki: 1 – pUC Mix Marker, 2 – ‘Grana’, 3 – ‘Dańkowskie Złote’, 4 – ‘Grana’ x ‘Dańkowskie Złote’, 5 – 1R, 6 – 2R, 7 – 3R, 8 – 4R, 9 – 5R, 10 – 6R, 11 – 7R, 12 – 3RS, 13 – 6RL, 14- 1B/1R, 15 – kontrola bez DNA, 16 – Low DNA Mass Ladder

Figure 2. PCR products achieved using SECA2 and SECA3 primers. Lanes: 1 – pUC Mix Marker (Fermentas), 2 – ‘Grana’, 3 – ‘Dankowskie Złote’, 4 – ‘Grana’ x ‘Dankowskie Złote’, 5 – 1R, 6 – 2R, 7 – 3R, 8 – 4R, 9 – 5R, 10 – 6R, 11 – 7R, 12 – 3RS, 13 – 6RL, 14 – 1B/1R, 15 – without DNA, 16 – Low DNA Mass Ladder.



Rycina 3. Produkty PCR uzyskane przy pomocy starterów R1 i R2. Ścieżki: 1 – ‘Grana’, 2 – ‘Dańkowskie Złote’, 3 – ‘Grana’ x ‘Dańkowskie Złote’, 4 – 1R, 5 – 2R, 6 – 3R, 7 – 4R, 8 – 5R, 9 – 6R, 10 – 7R, 11 – 3RS, 12 – 6RL, 13 – 1B/1R

Figure 3. PCR products obtained using R1 and R2 primers. Lanes: 1 – ‘Grana’, 2 – ‘Dankowskie Złote’, 3 – ‘Grana’x‘Dankowskie Złote’, 4 – 1R, 5 – 2R, 6 – 3R, 7 – 4R, 8 – 5R, 9 – 6R, 10 – 7R, 11 – 3RS, 12 – 6RL, 13 – 1B/1R

Do lokalizacji genów odpowiedzialnych za syntezę sekalin na chromosomach żyta 'Dańkowskie Złote' zastosowano metodę łańcuchowej reakcji polimerazy (STS-PCR). Technika STS-PCR umożliwia identyfikację poszczególnych loci dzięki amplifikacji fragmentu DNA pomiędzy parą starterów o znanej sekwencji [Talbert i in. 1994]. W obecności starterów SECA2 i SECA3 nastąpiła amplifikacja DNA w każdej z pięciu analizowanych roślin disomicznej linii addycyjnej 1R, linii substytucyjnej 1B/1R oraz w życie i oktoploidalnym pszenzycie 'Grana' x 'Dańkowskie Złote'. W formach tych stwierdzono obecność produktu PCR o wielkości 412 par zasad, odpowiadającego wielkością sekwencji genu kodującego ω -sekaliny pomiędzy starterami SECA2 i SECA3 (ryc. 2).

Lee i in. [1994] analizowali przy pomocy PCR z udziałem starterów R1 i R2 po kilka odmian pszenicy, żyta, pszenżyta, linii addycyjnych, substytucyjnych i translokacyjnych. Autorzy stwierdzili obecność produktu 473 par zasad tylko w liniach zawierających chromosom 2R lub jego ramię 2RS. Z uwagi na to, że startery R1 i R2 pochodziły z locus *Sec 2*, według autorów obecność produktu 473 par zasad powinna wiązać się z genem kodującym syntezę γ -sekalin typu 75K. Startery R1 i R2 włączono do PCR w celu przetestowania linii addycyjnych 'Grana' - 'Dańkowskie Złote'. Uzyskano amplifikacje DNA tylko w disomicznej linii addycyjnej 2R, życie 'Dańkowskie Złote' i oktoploidalnym pszenzycie 'Grana' x 'Dańkowskie Złote' (ryc. 3). W powyższych formach w każdej z pięciu losowo wybranych roślin amplifikacji uległ fragment DNA o długości 473 par zasad. Produkt ten odpowiada wielkością sekwencji genu kodującego γ -sekaliny pomiędzy starterami R1 i R2.

PODSUMOWANIE

Analiza rozdziału elektroforetycznego podjednostek glutenin wysokocząsteczkowych i sekalin oraz wyniki reakcji łańcuchowej polimerazy (STS-PCR) przeprowadzone w pełnym zestawie linii addycyjnych, linii substytucyjnej 1B/1R i formach wyjściowych świadczą o tym, że geny *Sec 1* i *Sec 2* odpowiedzialne za biosyntezę sekalin w życie 'Dańkowskie Złote' są zlokalizowane na krótkich ramionach chromosomów 1R i 2R.

PIŚMIENNICTWO

- Benito C., Frade J. M., Orellana J., Carrillo J.M. 1990. Linkage and cytogenetic maps of genes controlling endosperm storage proteins and isosymes in rye (*Secale cereale*). Theor. Appl. Genet. 79, 347–352.
- Busch W., Herrmann R.G., Martin R. 1995. Refined physical mapping of the *Sec-1* locus on the satellite of chromosome 1R of rye (*Secale cereale*). Genome 38, 889–893.
- Carrillo J.M., Vazquez J.F., Orellana J. 1990. Linkage relationships between the loci *Sec 1* and *Sec 3* in rye (*Secale cereale* L.). Heredity 64, 125–130, 54.

- De Bustos A., Rubio P., Jouve N. 2001. Characterisation of two gene subunits on the 1R chromosome of rye as orthologs of each of the *Glu-1* genes of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 103, 733–742.
- De Froidmont D. 1998. Research note a co-dominant marker for the 1BL/1RS wheat-rye translocation via multiplex PCR. *J. Cereal Sci.* 27, 229–232.
- Graybosch R.A. 2001. Uneasy unions: Quality effects of rye chromatin transfers to wheat. *J. Cereal Sci.* 33, 3–16.
- Korzun V., Malyshev S., Kartel N., Westermann T., Weber W.E., Börner A. 1998. A genetic linkage map of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 96, 203–208.
- Kumlay A.M., Baenziger P.S., Gill K.S., Shelton D.R., Graybosch R.A., Lukaszewski A.J., Wesenberg D.M. 2003. Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat. *Crop Sci.* 43, 1643–1651.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 4, 227, 680–685.
- Lafferty J., Lelley T. 2001. Introduction of high molecular weight glutenin subunits 5+10 for the improvement of the bread-making quality of hexaploid triticale. *Plant Breeding* 120, 33–37.
- Lawrence G.J., Shepherd K.W. 1981. Inheritance of glutenin protein subunits of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 60, 333–337.
- Lee J.H., Graybosch R. A., Lee D.J. 1994. Detection of rye chromosome 2R using the polymerase chain reaction and sequence-specific DNA primers. *Genome* 37, 19–22.
- Loarce Y., Hueros G., Ferrer E. 1996. A molecular linkage map of rye. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1112–1118.
- Ma X.F., Wanous M.K., Houchins K., Rodriguez Milla M.A., Goicoechea P.G., Wang Z., Xie M., Gustafson J.P. 2001. Molecular linkage mapping in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102, 517–523.
- Malyshev S.V., Khmyl T.O., Zabenkova K.I., Voylovkov A.V., Korzun V.N., Kartel N.A. 1998. RFLP-based mapping of the *Sec-2* and *Sec-5* loci encoding 75K γ -secalins of rye. *Plan Breeding* 117, 329–333.
- Milligan B.G. 1992. Plant DNA isolation. In: *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. IRL Press, Oxford, UK, 59–88.
- Orellana J., Fernandez-Calvín B., Vazquez J. F., Carrillo J. M. 1993. Mapping of genes controlling seed storage-proteins and cytological markers on chromosome 1R of rye. *Theor. Appl. Genet.* 85, 639–643.
- Payne P.I., Lawrence G. 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code high-molecular-weight subunits of glutenins in hexaploid wheat. *Cereal Res. Comm.* 11, 29–35.
- Payne P.I., Nightingale M.A., Krattiger A.F., Hold L.M. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of british-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40 51–65.
- Robin G., Banerjee M., Brown T.A. 1998. Evolution of the height molecular weight glutenin loci of the a A, B, D and G genomes of wheat. *Genome* 42, 296–307.
- Shewry P.R., Parmar S., Miller T.E. 1985. Chromosomal location of the genes for the Mr 75000 γ -secalins in *Secale montanum* Guss: Evidence for a translocation involving chromosomes 2R and 6R in cultivated rye (*Secale cereale* L.). *Heredity* 54, 381–383.
- Sybenga J., Parmar S., Von Eden J., Shewry P. 1991. Mapping of the seed storage protein locus *Sec-2* in rye. *Genetica* 84, 101–105.
- Talbert I.E., Blake N.K., Chee P.W., Blake T.K., Magyar G.M. 1994. Evaluation of sequence-tagged site PCR products as molecular markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87, 789–794.
- Van Campenhout S., Koebner R.M.D., Volckaert G. 2000. The applicability of consensus PCR primers across species and genera: the use of wheat Em sequences to develop markers for orthologues in rye. *Theor. Appl. Genet.* 100, 328–336.