

JERZY DRZEWIECKI¹**NATALIA D. TIKHENKO**²**NATALIA V. TSVETKOVA**²¹ Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie² Oddział Instytutu Genetyki Rosyjskiej Akademii Nauk im. N.I Wawilowa, Sankt-Petersburg, Rosja

Współdziałanie genomów pszenicy Chinese Spring i linii wsobnych żyta w pszenżycie na przykładzie ekspresji genów kodujących prolaminę ziarniaków

Genomic interaction between Chinese Spring wheat and rye inbred lines on the basis of expression of genes encoding grain prolamins

W pszenżycie prolaminę najczęściej dziedziczą się kodominacyjnie, w obrazie białek znaleźć można wszystkie prażki gliadyn i sekalin, pochodzące od obu komponentów rodzicielskich- pszenicy i żyta. W rezultacie współdziałania genomów powstają także nowe jednostki polipeptydowe białka, może zachodzić zjawisko supresji (tłumienia) genów kodujących poszczególne polipeptydy prolamin. Dotychczas zjawisko interakcji między genomami pszenicy i żyta w pszenżycie, na przykładzie ekspresji genów kodujących prolaminę ziarniaków badano na bardzo ograniczonym w liczbie materiale, od jednego do trzech genotypów pszenżyta. W niniejszej pracy badano zjawisko interakcji między genomami pszenicy i żyta na przykładzie 39 mieszańców pierwotnego pszenżyta oktoploidalnego otrzymanych przez krzyżowanie pszenicy Chinese Spring z 39 liniami wsobnymi żyta z kolekcji Sankt-Petersburgskiego Oddziału Instytutu Genetyki Rosyjskiej Akademii Nauk im. N.I Wawilowa w Sankt-Petersburgu. Wykonano rozdziały elektroforetyczne prolamin ziarniaków pszenicy Chinese Spring, linii wsobnych żyta i mieszańców pszenżyta w 7,5% żelu poliakrylanmidowym, w pH 3,1. Obraz elektroforetyczny prolamin badanych materiałów składa się z czterech frakcji (stref) prażków α , β , γ i ω . Wszystkie badane ziarniaki pszenicy Chinese Spring charakteryzowały się identycznym elektroforegramem gliadyn, natomiast w przypadku linii wsobnych żyta jednolitość obrazu sekalin stwierdzono jedynie u 26 linii (z badanych 39). U 19 mieszańców pszenżyta (z badanych 39) znaleziono w obrazie prolamin nowe, nie występujące u form rodzicielskich prażki, pojawiające się zwykle w białkowej frakcji elektroforetycznej ω . U trzynastu mieszańców stwierdzono brak w elektroforegramie prolamin od jednego do kilku prażków sekalin linii wsobnej użytej do otrzymania danego mieszańca pszenżyta.

Słowa kluczowe: elektroforeza, interakcja genomów, linie wsobne żyta, prolaminę, pszenica, pierwotne pszenżyto

In triticale prolamins usually are codominantly inherited; it is possible to find in electrophoretic protein pattern all parental bands, both gliadins and secalins. However, as a result of interaction, new polypeptide units may occur, while other ones may disappear. Electrophoretic protein patterns were studied in the collection of 39 primary octoploid triticales obtained by crossing the Chinese Spring wheat with 39 rye inbred lines. The material was delivered by the Plant Genetics Institute of Russian Academy of Sciences in Sankt-Petersburg. The protein electrophoresis was performed in 7.5% acrylamide gels, in pH 3.1. Electrophoretic protein patterns of all examined materials consisted of four zones of bands α , β , γ and ω . All the examined Chinese Spring wheat grains showed electrophoretically uniform gliadin pattern, whereas in case of rye inbred lines only 26 (of 39) were electrophoretically uniform. Nearly half of the examined triticale hybrids (19 of 39) had new, singular bands, usually in the ω zone of pattern, which did not occur in the parental forms. Thirteen triticale hybrids (of 39) has shown absence of one or several rye bands.

Key words: electrophoresis, genome interaction, rye inbred lines, prolamins, wheat, primary triticale

WSTĘP

Pszenżyto jest rośliną zbożową stworzoną przez człowieka w celu połączenia najlepszych cech rodziców — pszenicy i żyta. W zależności od sposobu otrzymania pszenżyto można podzielić na dwie formy: pszenżyto pierwotne i pszenżyto wtórne. Uzyskanie ziarniaków mieszańcowych z krzyżowania pszenicy z żytem nie jest łatwe. Za zdolność krzyżowania się pszenicy z żytem odpowiadają w genomie pszenicy geny *kr1* (recesywny)/*Kr1* (dominujący) oraz *kr2* (recesywny)/*Kr2* (dominujący). Do najłatwiej krzyżujących się z żytem należy heksaploidalna pszenica Chinese Spring (CS) o genotypie *kr1kr1kr2kr2* (podwójna homozygota recesywna).

Pierwotne pszenżyto oktoploidalne (AABBDDRR) jest najstarszą syntetyczną formą mieszańcową, powstała w wyniku krzyżowania pszenicy heksaploidalnej (AABBDD) z żytem diploidalnym (RR) i podwojenia liczby chromosomów (metodą kolchicynowania) w mieszańcach F_1 .

Uważa się, że pierwotne pszenżyto oktoploidalne nie nadaje się do uprawy. Powodem jest jego niestabilność cytogenetyczna i fizjologiczna, stosunkowo wysoki udział aneuploidów, nawet do 40% (Cuchija, 1978). Dla porównania, w polskich odmianach pszenżyta heksaploidalnego udział aneuploidów nie przekracza dziesięciu procent (Rogalska i in., 1991, Małuszyńska i in., 2001).

Genetyka pszenżyta oktoploidalnego jest słabo poznana (Gruszecka, 2005). Badania Schlegela (1996) wykazały, że chromosomy pszenicy i żyta w pszenżycie koniugują rzadko, występują za to różne zakłócenia prowadzące do fragmentacji i translokacji chromosomów. Sporadycznie, w wyniku translokacji 1BL/1RS, 1AL/RS, także 1DL/1RS następuje wymiana genów pomiędzy chromosomami pierwszych grup homeologicznych pszenicy i żyta (Tarkowski, 1998, Rogalska i in., 2007). Chen i Ni (2006) uważają, że w syntetycznych alloplodach obserwuje się dynamiczne zmiany w ekspresji genów i organizacji genomów, jak eliminacja poszczególnych fragmentów genomu, wymiany międzychromosomowe, metylowanie cytozyny, supresja genów rodzicielskich i aktywacja nowych genów, dominacja genetyczna i zmiany aktywności transpozonów.

Z drugiej strony nierzadkie są opinie o nieistotnej interakcji między genomami. Tarkowski (1998) uważa, że większość genów pszenicy i żyta funkcjonuje w pszenżycie niezależnie od siebie.

Uważa się, że głównym źródłem zmienności genetycznej w pszenżycie jest pszenica (Gruszecka, 2005), a zmienność pszenżyta wynikająca z interakcji pomiędzy genomami stanowi zaledwie 20% (Łukaszewski i Gustafson, 1983; Oettler, 1991).

Geny kodujące gliadyny heksploidalnej pszenicy (w tym pszenicy Chinese Spring) skupione są w sześciu loci, na krótszych ramionach chromosomów pierwszej i szóstej grupy homeologicznej (1A, 1B, 1D, 6A, 6B, 6D). Geny kodujące głównie α i β gliadyny zlokalizowano na krótkich ramionach chromosomów 6A, 6B i 6D (odpowiednio loci *Gli-A2*, *Gli-B2* i *Gli-D2*). Geny kodujące γ i ω gliadyny znajdują się na krótkich ramionach chromosomów 1A, 1B i 1D (odpowiednio loci *Gli-A1*, *Gli-B1* i *Gli-D1*).

Produktem ekspresji genów kodujących gliadyny są grupy polipeptydów (na elektroforegramach — grupy prążków) określanymi jako bloki białkowe (Metakovsky, 1991, Waga, 2000, Dragovicz i in., 2006). Każdy z loci kodujących gliadyny stanowi klaster ściśle sprzężonych genów, kontrolujących syntezę kilku polipeptydów gliadyn, dziedziczonych jako pojedyncza cecha mendelowska (Dragovicz i in., 2006). Skutkiem mutacji nieletalnych w obrębie klasterów powstały serie alleli wielokrotnych. Na przykład w obrębie lokusa *Gli-A1* stwierdzono występowanie 23 alleli wielokrotnych, głównie frakcji białkowych γ i ω (Sozinov, 1985).

Lokalizacja genów kodujących sekaliny żyta *Secale cereale* nie jest kompletna (Shewry i in., 1984). Sekaliny żyta *Secale cereale* L. kontrolowane są przez geny *Sec-1* (γ i ω -sekaliny) znajdujące się na krótkim ramieniu chromosomu 1R (oznaczanym 1RS) oraz przez geny *Sec-3* — na długim ramieniu tego chromosomu (nazywanym także 1RL). Geny *Sec-2* kodujące blok komponentów γ sekalin 75 kDa znajdują się na krótkim ramieniu chromosomu 2R (Konarev, 2001). Pozostałe chromosomy żyta (3R, 4R, 5R, 6R i 7R) kodują jedynie enzymy (Shewry i in., 1984, Konarev, 2001).

Uważa się (Konarev, 2001), że polipeptydy α -sekalin nie są kodowane przez chromosomy 1R i 2R żyta, stąd na elektroforegramach sekalin, we frakcji α prążków nie widać. We frakcjach β i γ prążki sekalin są nieliczne, natomiast w strefie ω odmiany i linie wsobne żyta charakteryzują się występowaniem od 5 do 15 prążków sekalin (Konarev, 2001).

W pierwotnym oktoploidalnym pszenżycie, w obrazie prolamin ziarniaków, we frakcji α znajdują się jedynie prążki gliadyn, we frakcji β i γ komponentów gliadynowych jest wyraźnie więcej niż sekalinowych, jedynie we frakcji ω prolamin pszenżyta sekaliny są licznie „reprezentowane” (Stefanowska, 1989; Rozynek i in., 1998; Konarev, 2001).

Porównano elektroforegramy prolamin ziarniaków pszenżyta z obrazem gliadyn i sekalin obu komponentów rodzicielskich mieszańca i stwierdzono, że gliadyny i sekaliny najczęściej dziedziczą się kodominacyjnie, w obrazie prolamin pszenżyta znaleźć można wszystkie prążki gliadyn i sekalin, pochodzące od pszenicy i żyta (Chen i Bushuk, 1969; Stefanowska, 1989; Rogalska i in., 1993; Tarkowski, 1998; Konarev, 2001; Gruszecka, 2004).

Wielu badaczy zauważyło ponadto w pszenżycie zjawisko supresji genów kodujących prolaminę jednego z komponentów rodzicielskich. Zauważono osłabienie intensywności pojedynczych prążków lub nawet zanik niektórych prążków, zwykle żyta (Stefanowska, 1989; Somers i in., 1992; Tarkowski i in., 1992; Carvalho i Vegas, 1996; Rozynek i in., 1998; Jagadev i Khanna, 2002; Gruszecka, 2004).

Jedynie Hristova i Baeva w 1972 roku doniosły o wykryciu techniką densytometrii w obrazie pszenżyta oktoploidalnego (Bezostaja-1 × Lozen -14) kilku nowych, niewystępujących u komponentów rodzicielskich prążków białka.

Voylokov i Tikhenko (1998, 2002, 2003) badali interakcję genomów pszenicy i żyta i ich ewolucję u pszenżyta. Wyniki ich badań sugerują, że liczne, a niejednoznaczne rezultaty badań nad pszenżycem i interakcją genomów mogą być związane z jego wysoką heterogenicznością na poziomie genomu, chromosomu i genu, także z zaburzeniami różnych epigenetycznych wzorów ekspresji genów. Analiza wtórnych form pszenżyta pod względem interakcji genomowej jest bardzo trudna, lepszym modelem do badań wydają się być pierwotne formy pszenżyta powstałe z użyciem linii wsobnych żyta.

Wielu autorów (Stefanowska, 1989; Carvalho i Vegas, 1996; Jagadev i Khanna, 2002) badało pierwotne pszenżyto oktoploidalne otrzymane ze skrzyżowania pszenicy Chinese Spring z żytem, pod względem oddziaływania między genomami pszenicy i żyta, na przykładzie ekspresji genów kodujących prolaminę. Wnioskowano, że gliadyny i sekaliny dziedziczą się kodominacyjnie, niemniej u części otrzymanych mieszańców zauważono brak w elektroforegramie prolamin pojedynczych prążków jednego z komponentów rodzicielskich. Badania prowadzone były na bardzo ograniczonym liczbowo materiale, od jednego do trzech genotypów form rodzicielskich i od jednego do trzech mieszańców pszenżyta.

W niniejszej pracy założyliśmy, że dopiero analiza białek genotypów pszenżyta otrzymanych na bazie jednej formy pszenicy i wielu linii wsobnych żyta może umożliwić wyjaśnienie roli genotypu żyta i poznanie specyficznego oddziaływania z genotypem pszenicy.

Celem badań było wyjaśnienie czy ekspresja genów kodujących prolaminę typu I (gliadyny i sekaliny) w ziarniakach pierwotnego pszenżyta oktoploidalnego ma charakter interakcji między genomami (powstają nowe, specyficzne dla pszenżyta prążki lub widoczne jest osłabienie ekspresji poszczególnych polipeptydów białek).

MATERIAŁ

Analizowany materiał obejmował ziarniaki genotypów rodzicielskich pszenżyta — heksaploidalnej pszenicy Chinese Spring i 39 linii wsobnych żyta (tab. 1) oraz mieszańców pierwotnego pszenżyta oktoploidalnego w liczbie 39, z kolekcji Uniwersytetu w Sankt-Petersburgu.

Mieszańce pszenicy z żytem otrzymano w latach 1996–2002. Rośliny mieszańców F₁ (2n = 28) kolchicynowano w celu podwojenia liczby chromosomów i następnie reprodukowano do pokolenia C2-C3 pod ścisłą izolacją.

METODA

Prolaminy pojedynczych ziarniaków (gliadyny, sekaliny i tritikosekaliny) ekstrahowano 70% roztworem etanolu. Ekstrakcję wykonano dla 100 pojedynczych ziarniaków pszenicy, co najmniej 28 ziarniaków poszczególnych linii żyta i od 30 do 50 ziarniaków mieszańców pszenżyta.

Analiza jednolitości elektroforetycznej polegała na rozdziale białek wyekstrahowanych z pojedynczych ziarniaków pszenicy, pszenżyta i żyta. Ekstrakty białkowe umieszczano w liczbie 28/żel, w jednym lub kilku (do trzech) powtórzeń.

W drugim etapie wykonano rozdziały elektroforetyczne ekstraktów białkowych pszenicy, pszenżyta i żyta, umieszczonych na żelach kolejno w następującym porządku: dwa pojedyncze ziarniaki pszenicy Chinese Spring (komponent mateczny), sześć pojedynczych ziarniaków mieszańca i dwadzieścia pojedynczych ziarniaków komponenta ojcowskiego — linii wsobnej żyta.

Elektroforezę białek wykonano w 7,5% żelu poliakrylamidowym, w środowisku kwaśnym (A-PAGE, pH 3,1), w systemie dwóch żeli tzw. elektroforezy nieciągłej (discontinuous) według metody Brzezińskiego (2003). Żele z elektroforegramami rozdziału białek skanowano urządzeniem CanoScan 9950F firmy Canon, przy pomocy programu PhotoStudio 5.5. Obróbkę graficzną elektroforegramów wykonano programem AdobePhotoshop Elements 2.0.

Obraz spektrum prolamin wszystkich trzech badanych gatunków podzielono na cztery strefy prążków, według zmniejszającej się mobilności białka w żelu, nazwanych kolejno α , β , γ i ω , według systemu ISTA (Handbook ISTA, 1992).

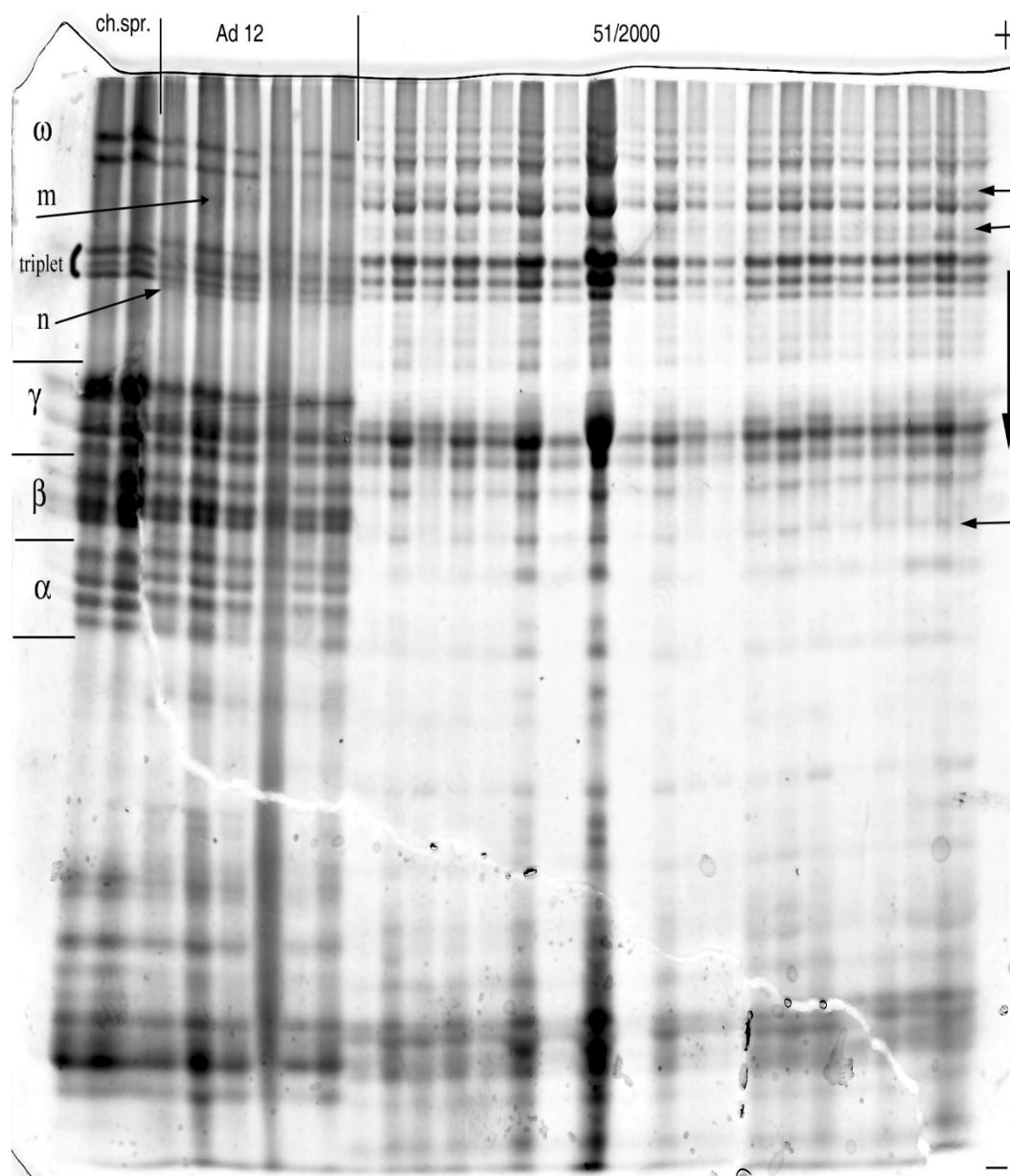
Rozdziały analizowano pod względem jednolitości elektroforetycznej genotypów (wszystkie badane formy), występowania ojcowskich prążków markerowych u Mieszańca, kodominacji (czy wszystkie prążki obu form rodzicielskich są obecne u mieszańca), supresji (osłabienia lub zaniku poszczególnych prążków) i „pojawienia” się nowych prążków w obrazie mieszańca.

WYNIKI

Elektroforegram prolamin nasion trzech badanych gatunków zbóż- pszenicy, pszenżyta i żyta składa się z czterech frakcji prążków, według zmniejszającej się mobilności białka w żelu, nazwanych kolejno α , β , γ i ω (rys. 1, 2, 3).

Obraz prolamin próby składającej się z 100 ziarniaków pszenicy Chinese Spring (CS) jest elektroforetycznie jednolity, jednoliniowy.

Linie wsobne żyta różnią się pod względem obrazu sekalin (rys. 1, 2, 3). Większość linii wsobnych była homozygotyczna (jednolita) pod względem obrazu sekalin (rys. 1 oraz tab. 1). Niemniej dwanaście linii (z badanych 39) charakteryzuje się niejednorodnością obrazu sekalin (rys. 2, 3 oraz tab. 1).



Objaśnienia: ch.spr- pszenica Chinese Spring, Ad 12- pszenżyto Ad 12, 51/2000- linia wsobna 51/2000. α , β , γ , ω - strefy spektrum obrazu białka

Strzałki ukośne (od lewej) pokazują prążek markerowy (m) i nowy prążek (n) u mieszańca. Strzałki poziome (od prawej) pokazują prążki sekalin linii wsobnej, niewidoczne u mieszańca. Triplet- triplet trzech prążków ω .

Rys. 1. Elektroforegram prolamin pszenicy CS, pszenżyta Ad 12 i linii wsobnej żyta 51/2000

Explanations: ch.spr- wheat Chinese Spring, Ad 12- triticale Ad 12, 51/2000-rye inbred line 51/2000. α , β , γ , ω - protein spectrum zones. Sloping arrows (from the left) show marker band (m) and new band (n). Horizontal arrows (from the right) show secalin bands of inbred line that are not visible in hybrid. Triplet- triplet of three ω bands.

Fig. 1. The electrophoregram of prolamins of CS wheat, triticale Ad 12 and rye inbred line 51/2000

W elektroforegramie mieszańców pszenżyta pochodzących z pszenicy prążków gliadynowych jest więcej niż pochodzących z żyta prążków sekalinowych (rys. 1, 2, 3). U większości badanych mieszańców znaleziono w obrazie białka od jednego do trzech prążków markerowych komponentu ojcowskiego (strzałki ukośne po lewej stronie rysunku, z indeksem „m”, rys. 1, 2, 3). Prążki markerowe to prążki specyficzne dla danej linii wsobnej prążki sekalin i występujące u mieszańca, niewystępujące u drugiego komponentu rodzicielskiego — pszenicy CS.

Tabela 1

**Jednolitość elektroforetyczna sekalin ziarniaków linii wsobnych żyta *Secale cereale* L.
Electrophoretical uniformity of grain secalins of rye inbred lines *Secale cereale* L.**

Linie jednolite, wyrównane Uniform lines	Linie z niewielką liczbą ziarniaków nietypowych (od dwóch do pięciu), w próbie 28 ziarniaków (dla każdej linii) Lines with a number of non-typical grains, the number of examined grains of each line was 28	Linie polimorficzne, niewyrównane Non-uniform, polymorphic lines
6/1997	18/1997	17/1996
13/2000	50/1996	58/1996
17/1999	56/1996	60/2000
21/1996	57/1996	T4/1996
22/1996	L5/1997	T53/1996
26/1996	H9/1996	Jar. 12/1996
33/2002		
35/1996		
39/1996		
40/1996		
44/2002		
45/1996		
51/2000		
53/2000		
H6/1996		
H12/1996		
T1/1996		
T5/1996		
T21/1996		
T36/1996		
T39/1996		
Jar.27/1996		
Jar.50/1996		
Jar.53/1996		
F9/1996		
F18/1996		
F26/1996		

Z badanych ogółem 39 mieszańców prawie połowa - 19 mieszańców charakteryzuje się nową cechą biochemiczną- w elektroforegramie prolamin przejawiają się nowe prążki, w liczbie od jednego do trzech, niewystępujące w komponentach rodzicielskich (strzałki ukośne po lewej stronie rysunku, z indeksem „n”, (rys. 1, 2, 3) oraz zestawienie tych mieszańców w tabeli 2). Charakterystyczne jest, że wśród mieszańców pszenżyta z nowymi, specyficznymi prążkami, trzy czwarte charakteryzuje się nowymi prążkami we frakcji ω (przykład — rys. 1, 3).

Większość nowych prążków ω zlokalizowano w pobliżu "tripletu" prążków ω , obecnego u pszenicy CS i dziedzicznego u pszenżyta (patrz zaznaczenie na rys. 1).

U trzynastu mieszańców zauważono efekt supresji lub eliminacji genów kodujących białka, która przejawia się brakiem jednego bądź kilku prążków sekalin w obrazie prolamin (rys. 1, 2, 3, tab. 2). Zanik prążków sekalin dotyczy wszystkich frakcji sekalin, ale w największym stopniu frakcji ω (rys. 1). U trzech mieszańców zauważono w obrazie prolamin pojedyncze, nowe, specyficzne prążki i jednocześnie supresję sekalin (rys. 1, 2, 3; tab. 2).

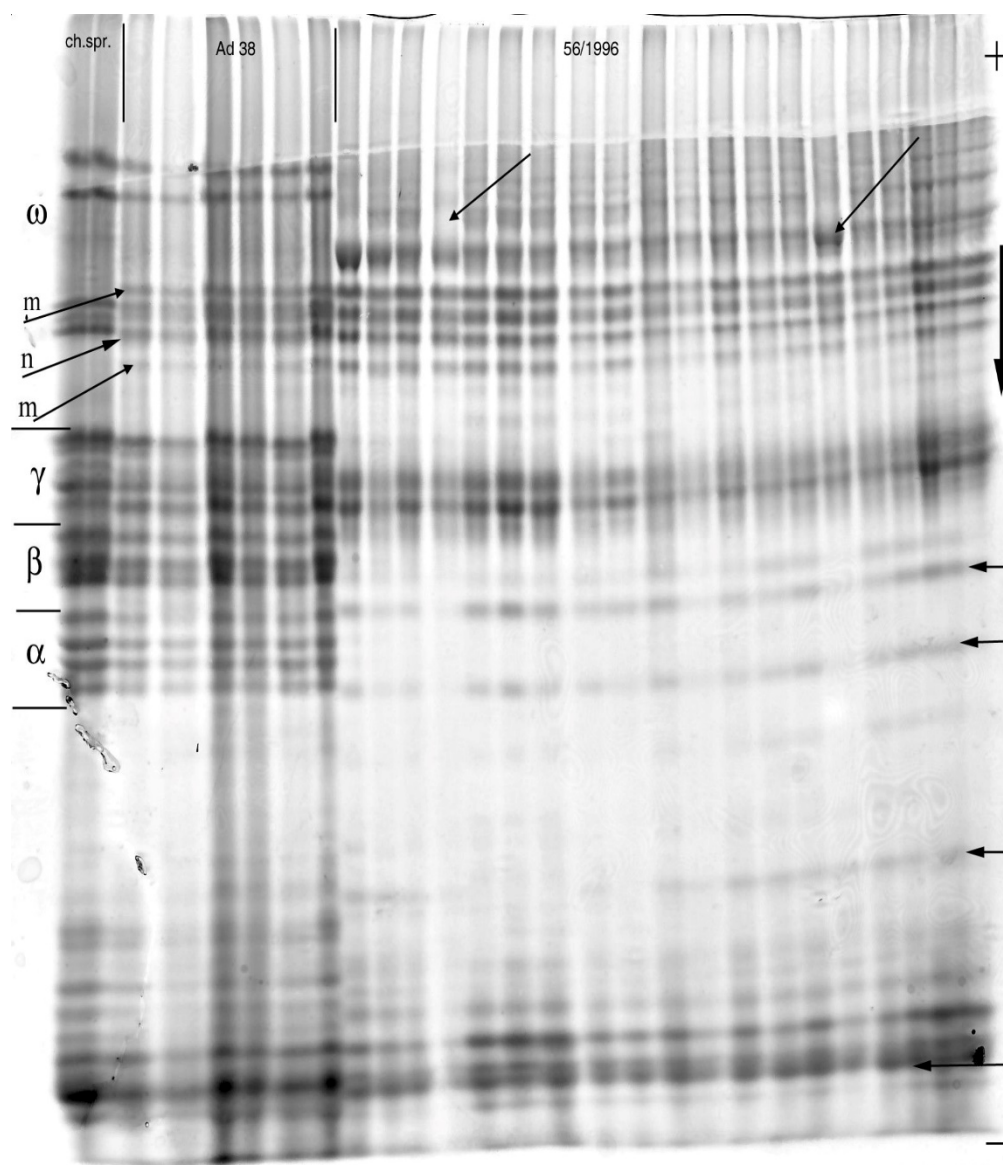
Tabela 2

Mieszańce oktoploidalnego pszenżyta, u których znaleziono w obrazie prolamin nowe prążki (niewystępujące u obu komponentów rodzicielskich), stwierdzono zjawisko supresji białka oraz takie mieszańce, u których nie znaleziono ani nowych prążków ani nie stwierdzono supresji białka
Hybrids of primary octoploid triticale where new bands in the prolamins pattern were found (that not occur in both parents), suppression of protein was noticed or hybrids where neither new bands nor protein suppression were noticed

Mieszańce z nowymi prążkami Hybrids with new bands	Mieszańce z supresją sekalin Hybrids in which suppression of secalins occurs
Ad 12 (CS × 51/2000)	Ad 2 (CS × L5/1997)
Ad 13 (CS × 17/1996)	Ad 7 (CS × 21/1996)
Ad 17 (CS × 22/1996)	Ad 12 (CS × 51/2000)
Ad 19 (CS × 6/1997)	Ad 13 (CS × 17/1996)
Ad 35 (CS × 50/1996)	Ad 34 (CS × 45/1996)
Ad 38 (CS × 56/1996)	Ad 38 (Cs × 56/1996)
Ad 39 (CS × 57/1996)	Ad 50 (CS × 44/2002)
Ad 43 (CS × H6/1996)	Ad 52 (CS × 53/2000)
Ad 45 (CS × 18/1997)	Ad 54 (CS × H9/1996)
Ad 47 (CS × 33/2002)	Ad 72 (CS × F26/1996)
Ad 61 (CS × H12/1996)	Ad 89 (CS × T39/1996)
Ad 76 (CS × 40/1996)	Ad 102 (CS × 13/2000)
Ad 80 (CS × T1/1996)	Ad 107 (CS × Jar.50/1996)
Ad 82 (CS × T5/1996)	mieszańce, u których nie znaleziono nowych prążków białka, ani nie zauważono supresji białka hybrids where neither new protein bands nor suppression of protein were noticed
Ad 84 (CS × T21/1996)	Ad 6 (CS × 58/1996)
Ad 87 (CS × T36/1996)	Ad 28 (CS × 35/1996)
Ad 89 (CS × T39/1996)	Ad 30 (CS × 39/1996)
Ad 97 (CS × Jar. 27/1996)	Ad 49 (CS × 17/1999)
Ad 101 (CS × Jar. 53/1996)	Ad 51 (CS × 60/2000)
	Ad 65 (CS × F9/1996)
	Ad 68 (CS × F18/1996)
	Ad 81 (CS × T4/1996)
	Ad 90 (CS × T53/1996)
	Ad 93 (CS × Jar.12/1996)

Objaśnienie tabeli 2: Ad- pierwotne pszenżyto oktoploidalne, CS-pszenica Chinese Spring
 Explanation for Table 2: Ad- primary octoploid triticale, CS- Chinese Spring wheat

U 10 mieszańców nie stwierdzono w obrazie prolamin uzyskanym techniką „kwaśnej” elektroforezy ani nowych, specyficznych dla pszenżyta prążków białek, ani zjawiska supresji sekalin (tab. 2).



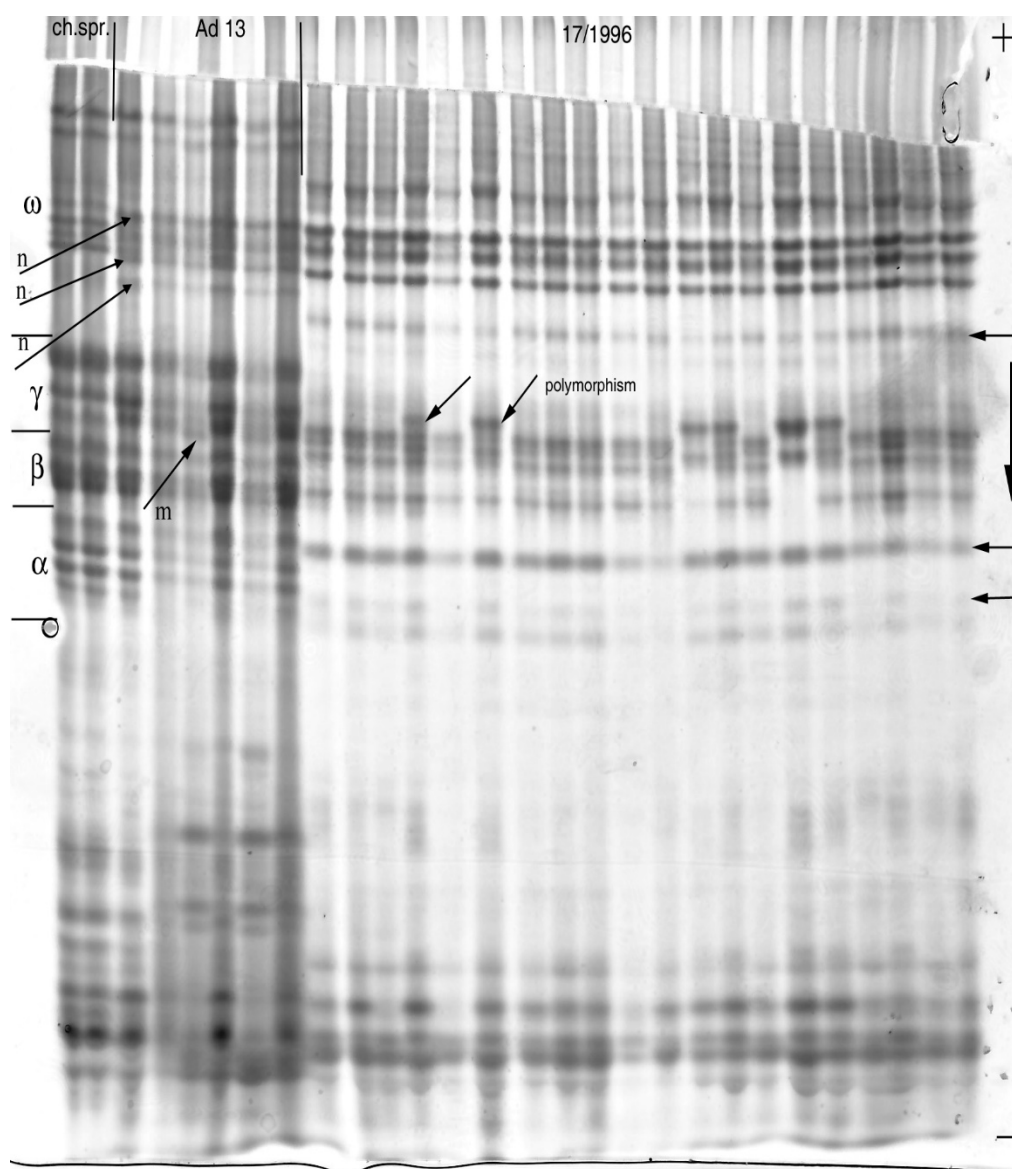
Objaśnienia: ch.spr- pszenica Chinese Spring, Ad 38- pszenżyto Ad 38, 56/1996- linia wsobna 56/1996. α , β , γ , ω - strefy spektrum obrazu białka

Strzałki ukośne (od lewej) pokazują dwa prążki markerowe (m) i pojedynczy nowy prążek (n) u mieszańca. Dwie strzałki ukośne (od prawej) pokazują niewyrównanie linii pod względem sekalin. Strzałki poziome (od prawej) pokazują prążki sekalin linii wsobnej, niewidoczne u mieszańca

Rys. 2. Elektroforegram prolamin pszenicy CS, pszenżyta Ad 38 i linii wsobnej żyta 56/1996

Explanations: ch.spr- wheat Chinese Spring, Ad 38- triticale Ad 38, 56/1996-rye inbred line 56/1996. α , β , γ , ω - protein spectrum zones. Sloping arrows (from the left) show two marker bands (m) and singular new band (n). Two sloping horizontal arrows (from the right) show non-uniformity inbred line on the base of secalins. Horizontal arrows (from the right) show secalins of rye inbred line that are not visible in the hybrid

Fig. 2. The electrophoregram of prolamins of CS wheat, triticale Ad 38 and rye inbred line 56/1996



Objaśnienia: ch.spr- pszenica Chinese Spring, Ad 13- pszenżyto Ad 17, 17/1996- linia wsobna 17/1996. α , β , γ , ω - strefy spektrum obrazu białka.

Strzałki ukośne (od lewej) pokazują jeden prążek markerowy (m) i trzy pojedyncze, nowe prążki (n) u mieszańca. Dwie strzałki ukośne (od prawej) pokazują niewyrównanie linii pod względem sekalin. Strzałki poziome (od prawej) pokazują prążki sekalin linii wsobnej, niewidoczne u mieszańca

Rys. 3. Elektroforegram prolamin pszenicy CS, pszenżyta Ad 13 i linii wsobnej żyta 17/1996

Explanations: ch. spr- wheat Chinese Spring, Ad 13- triticale Ad 13, 17/1996-rye inbred line 17/1996. α , β , γ , ω - protein spectrum zones. Sloping arrows (from the left) show two marker bands (m) and three singular, new bands (n) in the hybrid. Two sloping horizontal arrows (from the right) show non-uniformity of the inbred line on the base of secalins. Horizontal arrows (from the right) show secalins of rye inbred line that are not visible in hybrid

Fig. 3. The electrophoregram of prolamins of CS wheat, triticale Ad 13 and rye inbred line 17/1996

DYSKUSJA

W pracy przyjęliśmy założenie, że krzyżowanie wielu linii wsobnych żyta z pojedynczym genotypem pszenicy, w naszym przypadku pszenicą Chinese Spring jest najlepszym modelem analizy genów odpowiedzialnych za oddziaływania między genomami pszenicy i żyta.

Uzyskane metodą elektroforezy A-PAGE spektra białkowe prolamin ziarniaków pszenicy, pszenżyta i żyta charakteryzują się dobrą rozdzielczością polipeptydów białka w obrębie wszystkich frakcji spektrum prążkowego na elektroforegramach. W przypadku żyta potwierdzamy występowanie w obrazie frakcji ω -sekalin kilkunastu prążków białek o dużym ciężarze cząsteczkowym, mało mobilnych w żelach (jest to charakterystyczna cecha obrazu sekalin żyta), o czym donieśli już wcześniej inni badacze (Stefanowska, 1989; Rozynek i in., 1998; Konarev, 2001). Cytowani powyżej autorzy twierdzą natomiast, że po rozdziale elektroforetycznym sekalin w środowisku kwaśnym we frakcji α nie widać prążków.

Nam udało się uzyskać postęp w rozdziale α -sekalin. W obrazie elektroforetycznym sekalin linii wsobnych, we frakcji α wykryliśmy prążki, w liczbie od dwóch do czterech (rys. 1, 2, 3).

Wysoka rozdzielczość elektroforetyczna techniki A-PAGE w obrębie wszystkich czterech frakcji sekalin umożliwiła nam dokładniejszą analizę zmienności między ziarniakami w obrębie badanych linii, a tym samym pozwoliła określić stopień homozygotyczności linii. Wykryliśmy w badanym materiale znaczną liczbę linii niejednorodnych elektroforetycznie pod względem sekalin. Okoliczność ta nie jest bez znaczenia przy ocenie przydatności linii przy planowaniu następnych krzyżowań z pszenicą.

Zjawisko zmniejszenia intensywności niektórych prążków sekalin lub gliadyn u mieszańców i brak pojedynczych prążków komponentów rodzicielskich w mieszańcach pszenżyta było przedmiotem doniesień kilku autorów (Somers i in., 1992, Tarkowski, 1992; Rozynek i in., 1998; Konarev, 2002; Gruszecka, 2004). Nasze wyniki pokazują, że supresja sekalin ma większe znaczenie niż uważano dotychczas. Aż jedna trzecia z badanych linii „straciła” po skrzyżowaniu z pszenicą Chinese Spring pojedyncze polipeptydy sekalin, a u niektórych mieszańców zauważyliśmy brak nawet kilku prążków ojcowskiej linii wsobnej (rys. 1, 2, 3). Uważamy, że wykrycie zjawiska *s i l n e j* supresji genów kodujących sekaliny w pierwotnym pszenżycie oktoploidalnym stało się możliwe dopiero po udoskonaleniu czułości techniki elektroforezy i przede wszystkim po przeanalizowaniu większej liczby genotypów.

Zanik prążków sekalin może być wynikiem „reakcji na allopoliploidyzację” u pszenżyta. Reakcja ta polega na eliminacji sekwencji nukleotydowych, głównie powtarzalnych sekwencji żytnich (Ma i in., 2004; Salina i in., 2004; Rogalska, 2005). Eliminacja może obejmować aż do 15% *loci* (Ozkan i in., 2001; Shaked i in., 2001). Białka wyższych organizmów roślinnych (w tym zbóż) kodowane są przez niewielką, (około 10%) ale najistotniejszą pod względem genetycznym część genomu (Konarev, 2001). *Loci* kodujące białka zawierają praktycznie całą podstawową informację genetyczną o procesach

morfogenetycznych i metabolicznych organizmu. Nie wiemy, czy u pszenżyta eliminacja *loci* obejmuje geny kodujące białka sekalinowe, ale nie możemy wykluczyć istnienia takiego mechanizmu.

Supresja sekalin jest interesującym przykładem współdziałania genów pszenicy i żyta w mieszańcu. Może to być interesujący dowód specyficznego współdziałania genów i/lub aneuploidii chromosomowej. W rezultacie aneuploidii i utraty chromosomu lub chromosomów mogły zostać wyeliminowane geny kodujące frakcje prolamin. Z literatury wiadomo o wysokim udziale aneuploidów u tej formy pszenżyta, nawet do 40% (Cuchija, 1978).

Wpływ aneuploidii wymaga udowodnienia. Uważamy za celowe wykonanie powtórnych krzyżowań w celu uzyskanie bardziej stabilnych pod względem cytogenetycznym mieszańców F_1 o $2n = 28$. Zakładamy, że u mieszańców F_1 zjawisko aneuploidii jest mało znaczące i wtedy zanik niektórych prążków sekalin moglibyśmy wyjaśniać nie efektem ubytku chromosomu lub chromosomów, tylko współdziałaniem genów pszenicy i żyta w pszenżycie.

Z literatury znane jest tylko jedno doniesienie o pojawianiu się u mieszańców pszenicy i żyta nowych, specyficznych prążków prolamin (Hristova i Baeva, 1972).

Badacze zajmujący się problemem współdziałania genów pszenicy i żyta w pierwotnym pszenżycie oktoploidalnym nie wykryli w obrazach białek nasion mieszańca nowych form białek (Stefanowska, 1989; Carvalho i Vegas, 1996; Jagadev i Khanna, 2002). Naszym zdaniem może to wynikać ze stosunkowo niewielkiej liczby (1–3) analizowanych genotypów pszenżyta i ich komponentów rodzicielskich. Nam udało się znaleźć nowe, specyficzne dla mieszańców pszenżyta prążki prolamin, prawie u połowy (z 39 badanych).

O ile rezultaty prac Stefanowskiej (1989), Rogalskiej i wsp. (1993) i Tarkowskiego (1998) sugerują, że białko prolaminowe pszenżyta nie zawiera nowych podjednostek gliadynowych i sekalinowych i jest raczej mieszaniną (podkreślenie nasze) gliadyn i sekalin, co wskazywałoby na kodominacyjny system dziedziczenia tych białek w pszenżycie, to nasze badania wskazują na istnienie także innych mechanizmów ekspresji genów kodujących białka prolaminowe nasion w pszenżycie. Za przyjęciem takiego założenia przemawia nie tylko widoczna w obrazie prolamin pszenżyta supresja sekalin, ale przede wszystkim zmiana ekspresji genów kodujących, w postaci Występowania nowych form polipeptydów prolamin, specyficznych dla pszenżyta, u prawie połowy badanych mieszańców.

Charakterystyczne jest, że większość zmian w obrazie elektroforetycznym prolamin (nowe prążki, supresja), sugerujących współdziałanie genów pszenicy i żyta w pszenżycie, widoczna jest we frakcji ω -prolamin.

Sekaliny ω są kodowane przez *locus Sec-1* zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 1R żyta, ω gliadyny kodowane są przez *loci* znajdujące się na krótkich ramionach chromosomów pierwszej grupy homeologicznej 1A, 1B i 1D (odpowiednio *loci Gli-A1*, *Gli-B1* i *Gli-D1*).

Chromosom 1R żyta jest homeologiczny względem pierwszej grupy chromosomów pszenicy, a mapy genetyczne chromosomów są kolinearne (Devos i in., 1993). Na podstawie analizy pszenicy kolekcji VIR w Sankt-Petersburgu wiadomo, że w genomie

pszenicy chromosom żytni 1R może zastępować jeden z chromosomów pierwszej grupy homeologicznej (zwykle 1B/1R) albo ramiona telocentryczne chromosomów pszennego i żytniego łączą się, tworząc translokację (najczęściej spotyka się translokację T1BL-1RS, Konarev, 2001). Nie można wykluczyć w allopoliploidzie, którym jest pszenżyto, zmian epigenetycznych, nie związanych ze zmianami w sekwencji nukleotydowej. Zmiany ekspresji genów, ich „wyciszanie” mogą być skutkiem metylacji cytozyny, chemicznej modyfikacji histonów i aktywacji ruchomych sekwencji DNA.

WNIOSKI

1. Na podstawie występowania zmienności między ziarniakami pod względem obrazu sekalin wnioskuje się, że część linii wsobnych była niejednolita pod względem ekspresji elektroforetycznej sekalin.
2. U większości badanych mieszańców znaleziono markerowe prążki komponenta ojcowskiego, świadczące o prawidłowości przekrzyżowania genotypu matecznego z ojcowskim.
3. Obraz sekalin żyta jest uboższy w prążki od obrazu gliadyn pszenicy (zwłaszcza w strefach α , β i γ), w formule mieszańca- AABBDDRR chromosomy żyta stanowią $\frac{1}{4}$ całości. Czynniki te determinują dominację ilościową prążków gliadyn w obrazie mieszańca.
4. Prawie u połowy mieszańców znaleziono nowe, specyficzne (nie występujące u komponentów rodzicielskich) prążki prolamin. Może to być świadectwem wyraźnej interakcji między genami pszenicy Chinese Spring i linii wsobnych żyta. Wyrazem interakcji może być także widoczna u $\frac{1}{3}$ badanych mieszańców supresja (zanik) jednego-kilku prążków sekalin.
5. Większość zmian w obrazie elektroforetycznym prolamin (nowe prążki, supresja prążków), sugerujących współdziałanie genów pszenicy i żyta w pszenżycie widoczna jest we frakcji ω -prolamin.
6. Celowe jest uzyskanie mieszańców F_1 ($2n = 28$) i analiz cytologicznych liczby chromosomów dla badanych par genotypów pszenica/linia wsobna. Badania pozwoliłyby określić rolę aneuploidii we współdziałaniu genów pszenicy i żyta w pszenżycie i wpływu tego zjawiska na skład frakcji prolamin w pszenżycie.
7. Interesujące byłoby wyjaśnienie roli zmian epigenetycznych, niezwiązanych ze zmianami w sekwencji nukleotydowej, takich jak metylacja DNA, chemiczne modyfikacje histonów i aktywności elementów ruchomych w ekspresji genów prolaminowych w mieszańcach pszenicy i żyta.

LITERATURA:

- Brzeziński W. 2003. Wiadomości odmianoznawcze Katalog elektroforetyczny zarejestrowanych w Polsce odmian pszenicy, pszenżyta, jęczmienia i owsa. Zeszyt 78, Słupia Wielka.
- Carvalho V., Vegas W. 1996. Intergenomic interaction In wheat \times rye hybrids non – additive expression of gliadins and isozymes. *Triticale: Today and Tomorrow*: 149 — 154. Kluwer Acad. Publ.

- Chen C. H., Bushuk W. 1969. Nature of proteins in *Triticale* and its parental species III. A comparison of their electrophoretical patterns. *Can. J. Plant Sci.* vol. 50: 25 — 30.
- Chen Z. J., Ni Z. 2006. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays* 28: 240 — 252.
- Cuchija T. 1978. Citologiczeskaja stabilnost' triticales. *Tritikale*. Moskva, izdat. Kolos: 80 — 105.
- Devos R. M., Atkinson M. D., Chonoy C. N. 1993. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Gen.* 73: 197 — 208.
- Dragovicz A. Ju., Zima V. G., Fisenko L. A., Bespalova L. A., Bukreeva G. I., Mel'nikova E. E., Puchalskij V.A. 2006. Sopotavlenije dwuch suscestvujuscich katalogov allelej gliadinkodirujuscich lokusov u ozimoj mjadgkoj pszenicy. *Genetika*, 42, 8: 1107 — 1116.
- Gruszecka D. 2004. Wpływ form rodzicielskich na skład frakcji protaminowej w ziarniakach roślin mieszańcowych pszenżyta. W: Krajewski P., Zwierzykowski Z., Kachlicki P. (red.). *Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych*, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu: 413 — 419.
- Gruszecka D. 2005. *Zarys Genetyki Zbóż. Pszenżyto, kukurydza i owies*. Praca zbiorowa pod redakcją A.G. Górnego, IGR PAN, Poznań.
- Handbook of Variety Testing, Electrophoresis Testing. Ed. by ISTA, Zurich, 1992.
- Hristova J., Baeva R. 1972. Untersuchungen zur Natur der Proteinphänotypen bei *Triticale*. *Z. Pflanzenzüchtg.* vol. 67: 327 — 336.
- Jagadev P. N., Khanna V. K. 2002. A study of cross ability mechanism, isozyme analysis and organogenesis from wheat embryos in wheat — rye crosses. *Proc. 5th Int. Triticale Symp. IHAR Radzików, Poland*, I: 105 — 108.
- Konarev V. G. 2001. *Morfogenez i molekularno-biologiczeskij analiz rastenij*. Wyd. VIR, Sankt-Petersburg: 279.
- Łukaszewski A. J., Gustafson J. P. 1983. Translocations and modifications of chromosomes in triticales × wheat hybrids. *Theor. Appl. Gen.* 64: 239 — 248.
- Ma X. F., Fang G., Gustafson J. P. 2004. Polyploidization-induced genome variation in triticales. *Genome* 47: 839 — 848.
- Małuszyńska E., Drzewiecki J., Łapiński B. 2001. Tożsamość nietypowych roślin pszenżyta na podstawie analizy elektroforetycznej i cytogenetycznej ziarniaków. *Biul. IHAR* 218/219: 251 — 259.
- Metakovsky E. V. 1991. Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. Breed.* 45: 325 — 344.
- Oettler G., Wehmann F., Utz H.F. 1991. Influence of wheat and rye parents on agronomic characters in primary hexaploid and octoploid triticales. *Theor. Appl. Gen.* 81: 401 — 405.
- Ozkan H., Levy A., Feldman M. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell* 13: 1735 — 1747.
- Rogalska S., Cybulska-Augustyniak J., Kalwinek A. 1991. Aneuploidy in Polish cultivars of winter triticales. *Genet. Pol.* 32, 1/2: 11 — 16.
- Rogalska S., Cybulska-Augustyniak J., Mikulski W. 1993. Otrzymywanie nowych genotypów triticales o dobrych właściwościach technologicznych. *Biul. IHAR* 187: 133 — 137.
- Rogalska S. M. 2005. Genome diversity of triticales (*X Triticosecale* Witt.) using the chromosome heterochromatin marker in plant genome: Biodiversity and Evolution. Sharma A. K., Sharma A. (ed.). Science Publ., Inc., Enfield USA 1, B: 179 — 194.
- Rogalska S., Achrem M., Kalinka A. 2007. Mechanizmy zmian genomowych i zmian w ekspresji genów w mieszańcowych poliploidach roślin. *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych*. 56, 3-4: 421 — 433.
- Rozynek B., Günther T., Hesemann C-U. 1998. Gel electrophoretic investigations of prolamins in eu- and alloplasmatic octoploid primary triticales forms. *Theor. Appl. Gen.* 96: 46 — 51.
- Salina E. A., Numerova O. M., Ozkan H., Feldman M. 2004. Alteration in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat. *Genome* 47: 860 — 867.
- Schlegel R. 1996. *Triticale: Today and Tomorrow*: Kluwer Acad. Publ.: 21 — 31.
- Shaked H., Kashkush K., Ozkan H., Feldman M., Levy A. A. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploids in wheat. *Plant Cell* 13: 1749 — 1759.

- Shewry P. R., Bradbery D., Franklin J., White R. P. 1984. The chromosomal locations and linkage relationships of the structural genes for the prolamin storage proteins (secalins) of rye. *Theor. Appl. Gen.* 69: 63 — 69.
- Somers D. J., Gustafson J. P., Filion J.P. 1992. The influence of the rye genome on expression of heat shock proteins in triticale. *Theor. Appl. Gen.* 83: 987 — 993.
- Stefanowska G. 1989. Zależność składu frakcji prolaminowej oktoploidnego pszenżyta (X *Triticale* Wittmack) od form wyjściowych pszenicy (*Triticum aestivum* L.) i żyta (*Secale cereale* L.). *Biul. IHAR* 183: 95 — 98.
- Sozinov A. A. 1985. Polimorfizm belkov i jego znaczenie v genetike i selekcii. Nauka, Moskwa: 272 s.
- Tarkowski C., Gruszecka D., Stefanowska G., Makarska E. 1992. A comparison of prolamin fraction in the grains of triticale hybrids with wheat and rye. *Genetica Polonica* 33: 249 — 253.
- Tarkowski C. 1998. Biologiczno-genetyczne właściwości pszenżyta. *Biul. IHAR* 205/206: 133 — 135.
- Tikhenko N. D., Tsvetkova N. V., Voylokov A. V., 2003. The effect of parental genotypes of rye lines on the development of quantitative traits in primary octoploid triticale: Plant height. *Genetika* 39: 64 — 69.
- Voylokov A. V., Tikhenko N. D. 1998. Identification and localization of rye polymorphic genes specifically expressed in Triticale. *Proc. 4th Int. Triticale Symp.*, Red Deer, Alberta, Canada 290 — 296.
- Voylokov A. V., Tikhenko N. D. 2002. Triticale as a model for study of genome interaction and genomic evolution in allopolyploid plants. *Proc. 5th Int. Triticale Symp.* IHAR Radzików, Poland, I: 63 — 70.
- Waga J. Syntetyczna metoda klasyfikacji białek gliadynowych. 2000. *Biul. IHAR* 215: 35 — 60.

PODZIĘKOWANIE

Składam podziękowanie następującym osobom, które pomogły mi przygotować niniejszą pracę:

- *Pani Wiesławie Kaczorowskiej za wykonanie rozdziałów elektroforetycznych,*
- *Panu mgr Adamowi Mrówczyńskiemu z Zakładu Nasiennictwa i Nasionoznawstwa IHAR za pomoc w redagowaniu pracy,*
- *Panu dr A. V. Voylokov z Oddziału Instytutu Genetyki Rosyjskiej Akademii Nauk im. N.I Wawilowa w Sankt-Petersburgu za udostępnienie linii wsobnych żyta do analizy.*