

Possibilités d'identification de certains chromosomes de seigle à l'aide de marqueurs biochimiques

M. BERNARD, J.-C. AUTRAN* et P. JOUDRIER*

*Station d'Amélioration des Plantes,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Domaine de Crouelle — 63100 Clermont-Ferrand*

** Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I.N.R.A.,
16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris*

Résumé

L'analyse électrophorétique de la fraction gliadine et de la bêta-amylase de différentes lignées d'addition chromosomique Blé-Seigle a permis de mettre en évidence :

- d'une part, que les composants gliadines du Seigle sont sous la dépendance du chromosome 1 R,
- d'autre part, que le chromosome 5 R est impliqué dans la synthèse des isozymes bêta-amylase du Seigle.

Introduction

La réalisation des programmes destinés à exploiter les croisements interspécifiques et intergénériques, notamment chez les *Triticinae*, nécessite la compréhension préalable des relations phylogénétiques entre les espèces utilisées et une bonne connaissance des groupes d'homéologie chromosomique. Or, les méthodes cytogénétiques qui permettent d'arriver à ces fins sont longues, délicates et relativement imprécises, de sorte qu'il est devenu indispensable d'avoir recours à des techniques complémentaires. Il a été précisément démontré que des homéologies pouvaient être mises en évidence par des méthodes biochimiques simples, notamment par comparaison des électrophorogrammes de divers types de protéines.

La recherche de marqueurs biochimiques de gènes se trouve par ailleurs facilitée chez les végétaux où les additions et les substitutions chromosomiques sont réalisables. Rappelons que, dans le cas du Blé et du Seigle, plusieurs lignées présentant de telles additions ou substitutions ont été obtenues (RILEY, 1960; BHATTACHARYYA *et al.*, 1961; SEARS, 1968; GUPTA, 1972; BERNARD, 1976) et que leur étude s'est révélée extrêmement précieuse pour les études de contrôle génétique des protéines.

Ainsi, grâce à l'utilisation de lignées nulli-tétrasoniques du Blé « *Chinese Spring* » et de lignées d'addition du Seigle « *King II* » sur le Blé « *Holdfast* », SHEPHERD (1968) a montré par électrophorèse que les protéines de réserve de type prolamine, dont on a souligné par ailleurs l'intérêt en matière d'identification des variétés (AUTRAN, 1975; AURIAU *et al.*, 1976), étaient sous la dépendance des chromosomes 1 et 6 de chacun des génomes du Blé et du chromosome 1 R du Seigle.

De même, à partir de lignées d'addition, il a été démontré que le chromosome 3 R du Seigle porte un (ou des) gène(s) responsable(s) de la synthèse d'une estérase, cette enzyme dépendant chez le Blé du groupe homéologue 3 (BARBER *et al.*, 1968). Dans le cas de l'alcool déshydrogénase, les gènes impliqués sont localisés sur le groupe homéologue 4 du Blé (HART, 1970) et sur le chromosome 4 R du Seigle (IRANI et BHATIA, 1972). Récemment, TANG et HART (1975), étudiant plusieurs systèmes isoenzymatiques : l'alcool déshydrogénase, la glutamate oxaloacétate transaminase, la phosphatase acide, l'endopeptidase et l'aminopeptidase, ont pu mettre en évidence quels étaient les chromosomes du Seigle impliqués dans leur synthèse.

On peut cependant constater qu'aucun travail similaire n'a encore été réalisé sur la bêta-amylase (laquelle intervient, comme on le sait, pour la valeur boulangère). L'objet du présent article est de faire état des recherches entreprises pour identifier le(s) chromosome(s) du Seigle impliqué(s) dans la synthèse de cette enzyme.

Parallèlement, on a jugé utile d'associer aux résultats obtenus sur ces protéines enzymatiques les travaux récemment réalisés sur des protéines de réserve de type prolamine, dans le but de préciser les conclusions de SHEPHERD (1968, 1973) et de s'assurer des possibilités de leur application aux matériels français.

Dans les deux cas, l'étude est fondée sur l'analyse des lignées d'addition chromosomique Blé-Seigle isolées par BERNARD (1976) : elle a pour objectif de tester des méthodes analytiques simples permettant de préciser la nature des introgressions réciproques observées à la suite de croisements Triticale \times Blé.

Matériels et méthodes

1. — Matériels utilisés

La variété de Blé hexaploïde « FEC 28 », un Seigle (lignée 10, issue de « Petkus »), ainsi que les lignées d'addition disomiques ($2n = 44$) Blé-Seigle correspondantes : F, D, B, A, E, C portant respectivement les paires de chromosomes : 1, 2, 3/7, 4, 5 et 7/3 R, ont été examinées. Le triticale T 204 ($2n = 56$), issu du croisement « FEC 28 » \times Seigle 10 réalisé par Y. CAUDERON, a été étudié pour servir de contrôle.

Les variétés de Blé tendre « Capitole », « Clément », « Benno », « Aurora », « Kaukaz » ont également été analysées.

2. — Méthodes expérimentales

a) Extraction et Fractionnement des gliadines

Chaque grain, préalablement écrasé, est incubé durant une nuit dans 150 μ l de chloro-2-éthanol 25 p. 100 à 20 °C afin d'en solubiliser la fraction gliadine. La

suspension ainsi obtenue est directement utilisée pour le dépôt des protéines en électrophorèse.

Le gel d'amidon, utilisé comme support d'électrophorèse, est préparé au moyen d'amidon CONNAUGHT, chauffé à 80 °C, à une concentration de 10 p. 100 dans du tampon lactate d'aluminium (pH = 3,2, μ = 0,0045).

L'appareillage utilisé est l'AMIDOPHOR (OSI-PLÉUGER) : gels de dimension 320 × 120 × 6 mm. Après deux heures de précurant à 8 V/cm et environ 20 mA par gel, les protéines sont déposées dans le gel au moyen de rectangles de papier Whatmann n° 3 (10 mm × 5 mm) imbibés de la solution d'extraction. La migration proprement dite a lieu durant 4 h 45 mn à 8 V/cm et environ 20 mA par gel. Le gel est alors découpé dans son épaisseur, la partie supérieure est éliminée, la révélation des bandes ayant lieu sur la partie inférieure. La coloration est effectuée par la nigrosine 0,05 p. 100 en milieu trichloracétique 2 p. 100 durant une nuit. Le gel est alors rincé dans l'éthanol 40 p. 100 pour éliminer l'excès de colorant. On le conserve indéfiniment dans cette même solution.

Les bandes peuvent être repérées grâce à leur mobilité relative soit à partir du gel, soit à partir d'une photographie. L'échelle des mobilités va de 0 (dépôt) à 100 (alpha-gliadine la plus rapide), le constituant majeur des gamma-gliadines de Blé tendre servant de marqueur.

b) *Extraction, fractionnement et révélation spécifique des bêta-amyloses*

A partir d'un grain écrasé, la bêta-amylase totale (JOURRIER et BOURDET, 1972), c'est-à-dire la totalité des formes libres et liées de la bêta-amylase, est obtenue par incubation durant une nuit dans 200 μ l de mercaptoéthanol 0,2 M-NaCl 0,5 M (pH = 7) à 20 °C.

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 7,5 p. 100 en tampon lactate d'aluminium (pH : 3,2; μ = 0,05). Après migration durant 5 heures à 8 V/cm, les isozymes bêta-amylase sont révélées spécifiquement : le gel est coupé en deux longitudinalement puis incubé à 40 °C pendant 30 mn dans une solution d'amidon 1 p. 100 (pH = 4,5). Après lavages à l'eau, il est mis au contact d'une solution iodo-iodurée (2,6 g d'iode et 6 g d'iodure de potassium par litre). Les bandes ayant une activité bêta-amylosique apparaissent en clair sur fond bleu-noir. Le gel est conservé dans une solution d'acide trichloracétique-éthanol-eau, puis photographié.

Les isozymes ont été réparties en trois groupes C₁, C₂ et C₃, et leur présence ou leur absence nous ont permis de définir 6 types de zymogrammes distincts (JOURRIER et BERNARD, 1977; AURIAU *et al.*, 1976).

c) *Obtention des lignées d'addition Blé-Seigle*

Les sept lignées d'addition, dont une très instable G, non analysée ici, ont été isolées dans les descendances des back-cross : (T 204 = (FEC 28 × Seigle 10)) × (FEC 28)². Le détail de ce travail est mentionné dans une publication antérieure (BERNARD, 1976). Par confrontation avec le jeu de lignées « *Holdfast* »- « *King II* » obtenu par RILEY (1960), nous avons pu préciser les groupes homéologues auxquels se rattachent ces lignées d'addition, avec une ambiguïté pour deux d'entre elles (B et C).

Résultats et discussion

I. — Étude de la fraction gliadine

L'analyse des lignées d'addition Blé-Seigle doit permettre l'identification de la (ou des) paire(s) de chromosomes du Seigle impliquée(s) dans la synthèse des composants gliadines.

La figure 1 montre précisément que toutes les lignées d'addition présentent des diagrammes identiques à celui du blé « *FEC 28* », à l'exception de la lignée F qui porte plusieurs composants supplémentaires (mobilités 45, 50, 53, 56, 73, 78). De toute évidence, ces composants proviennent du Seigle car ils caractérisent le diagramme de cette espèce et apparaissent aussi dans tous les Triticale, notamment T 204.

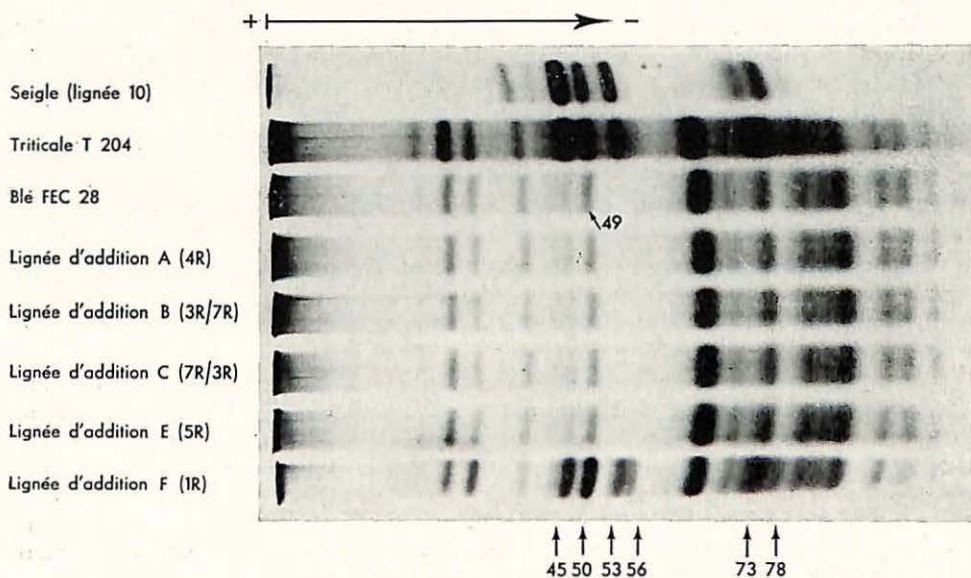


FIG. 1. — Diagrammes électrophorétiques en gel d'amidon (tampon lactate d'Al, pH 3,2) de la fraction gliadine de 5 lignées d'addition chromosomique Blé-Seigle comparativement aux témoins Blé, Seigle et Triticale.

Les composants majeurs du diagramme du Seigle sont donc vraisemblablement sous la dépendance du chromosome correspondant à la lignée F (chromosome 1 R). Une confirmation de ce résultat est apportée par l'analyse électrophorétique de la variété de Blé « Clément » qui possède le chromosome 1 R (ou un fragment de ce chromosome) dans son génome. La figure 2 montre que le diagramme de « Clément » porte des composants majeurs de mobilités 45 et 53, que l'on ne rencontre pratiquement jamais chez les autres blés, et qui ont donc été très probablement apportés par le Seigle. Le diagramme de « Clément » apparaît finalement assez voisin de celui d'un Triticale. On note également que les variétés « Benno », « Aurora » et « Kaukaz » renferment, entre autres, les mêmes composants 45 et 53, ce qui confirme qu'elles possèdent au moins un fragment du chromosome 1 R (METTIN, BLUTHNER et SCHLEGEL, 1973).

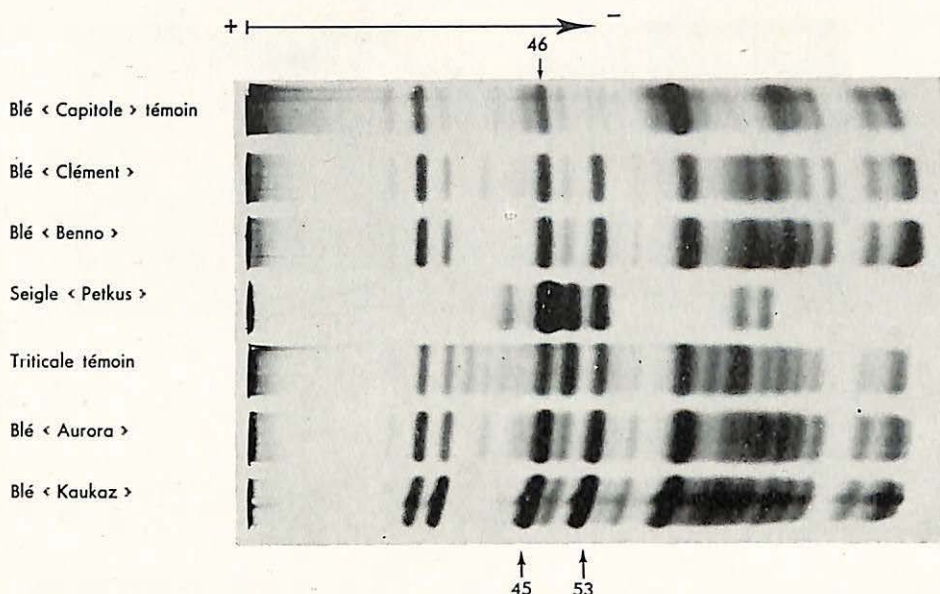


FIG. 2. — Diagrammes électrophorétiques en gel d'amidon (tampon lactate d'al, pH 3,2) de la fraction gliadine de 4 blés supposés renfermer un fragment du chromosome 1R du Seigle, comparativement aux témoins : Blé « Capitole », Seigle et Triticale.

Les composants majeurs du diagramme gliadine du Seigle constituent donc des marqueurs du chromosome 1 R. On rappelle que chez le Blé, les gliadines dépendent des groupes 1 et 6 (SHEPHERD, 1968; WRIGLEY et SHEPHERD, 1973; AUTRAN, 1975). Chez le Seigle, au contraire, (bien que la lignée d'addition G qui correspond au groupe 6 d'homéologie, n'ait pas pu être analysée ici), il semble bien que le seul chromosome 1 R contrôle toutes les gliadines, ce qui confirme les résultats de SHEPHERD et JENNINGS (1971), et de SHEPHERD (1973).

2. — Étude de la bêta-amylase

Les résultats sont donnés dans la fig. 3. D'après la nomenclature des isozymes bêta-amylase (JOUDRIER, 1974), il apparaît que la variété de blé tendre « *FEC 28* » (dépôt 1) est du type bêta-amylasique II, et que la lignée de Seigle s'apparente au type VI (dépôt 3). Le Triticale T 204, étant du type I (dépôt 2) a donc un zymogramme qui correspond à la somme de ceux du Blé et du Seigle.

En ce qui concerne les différentes lignées d'addition Blé-Seigle analysées (dépôts 4 à 9), seule la lignée E (dépôt 5), qui correspond au groupe 5 d'homéologie, se différencie des autres par la présence d'un groupe d'isozymes supplémentaires (C 2), de sorte que son zymogramme est identique à celui du Triticale T 204. On peut donc raisonnablement penser que la paire de chromosomes du Seigle portée par la lignée E est responsable de la synthèse des constituants bêta-amylasiques de ce dernier, donc que les isozymes du groupe C 2 du seigle dépendent du chromosome 5 R.

Des travaux récents ont montré que les groupes C 1 et C 3 du zymogramme du Blé tendre sont respectivement sous la dépendance des bras chromosomiques 4 A β et 4 D r (JOUDRIER et CAUDERON, 1976). Par analogie avec d'autres travaux,

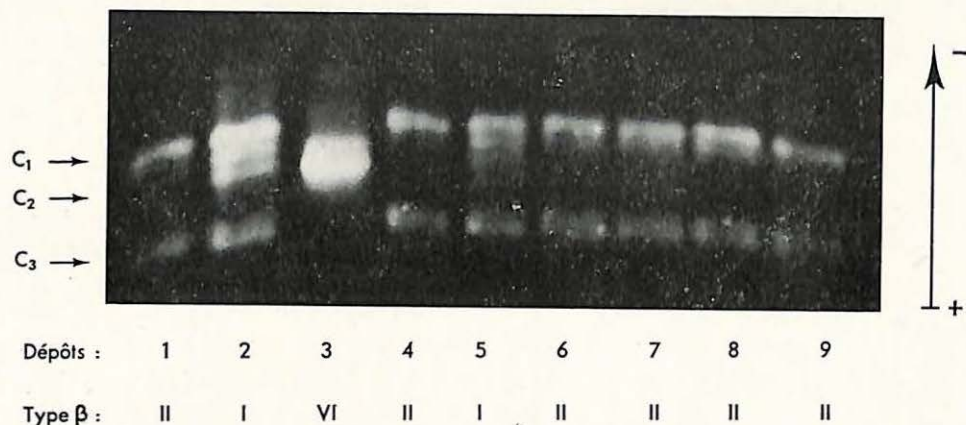


FIG. 3. — Zymogramme en gel de polyacrylamide (Tampon lactate d'Al., pH 3,2) des β -amylases de 6 lignées d'addition Blé-Seigle, comparativement aux témoins Blé, Seigle et Triticale. 1-Blé FEC 28 »; 2-Triticale T 204; 3-Seigle, lignée 10; 4-lignée d'addition A (4R); 5-Lignée E (5R); 6-Lignée B (3R/7R); 7-Lignée C (7R/3R); 8-Lignée D (2R); 9-Lignée F (1R).

notamment ceux cités en introduction, on pouvait penser que le groupe homéologue 4 était impliqué dans la synthèse de l'ensemble des constituants de la bêta-amylase.

Sans préjuger de l'identité réelle des isozymes du Seigle qui, en raison de leurs caractéristiques de mobilité, peuvent être assimilés à ceux du groupe C₂ des blés de type I, III, V et VI, on pouvait penser que le groupe « C₂ du Seigle » était sous la dépendance du chromosome 4 R.

Il semble au contraire, d'après les résultats obtenus ici, que les bêta-amylases du Seigle dépendent du chromosome 5 R et que, comme pour d'autres enzymes, notamment les peroxydases (KOBREHEL et FEILLET, 1975), les chromosomes de deux groupes homéologues différents soient concernés.

Bien que la variabilité isoenzymatique de la bêta-amylase du Seigle ait été encore insuffisamment étudiée, ce premier résultat paraît confirmer les observations de DARVEY (1973). Cet auteur a, en effet, montré que les chromosomes 4 R, 5 R et 6 R jouaient un rôle privilégié dans la manifestation de l'échaudage du grain de Triticale.

En ce qui concerne le rôle du chromosome 6 R, on peut faire l'hypothèse qu'il est responsable de la synthèse de l'alpha-amylase, car NISHIKAWA (1971) a démontré que cette enzyme dépendait du groupe homéologue 6 du Blé. Par ailleurs, SHEALY et SIMMONDS (1973), étudiant les manifestations histologiques et biochimiques de l'échaudage du grain de Triticale en cours de maturation, ont montré qu'il existait une synthèse précoce d'alpha-amylase entraînant une digestion prématurée des grains d'amidon. Cette hydrolyse devant se faire simultanément par la bêta-amylase, il est possible que la responsabilité du chromosome 5 R intervienne à ce niveau.

Conclusions

L'analyse biochimique de 6 lignées d'addition Blé-Seigle a permis de mettre en évidence, d'une part :

— que les principaux constituants du diagramme gliadine du Seigle dépendent du seul chromosome 1 R, résultat qui confirme celui de SHEPHERD (1973);

— que la présence du chromosome 1 R ou d'un fragment de ce chromosome, peut être décelée dans le génome d'une variété de Blé tendre (cas de « Clément » « Benno », « Aurora » et « Kaukaz ») et d'autre part :

— que le chromosome 5 R est impliqué dans la synthèse de la bêta-amylase du Seigle.

Ces conclusions montrent que des marqueurs biochimiques peuvent apporter des solutions rapides au problème d'identification des chromosomes du Seigle, si les constituants étudiés sont électrophorétiquement distincts de ceux du Blé.

Après examen des lignées d'addition, il est possible de déduire non seulement la localisation du ou des gènes responsables de la synthèse des marqueurs analysés, mais également de donner, soit une confirmation, soit une première indication, sur le groupe d'homéologie éventuellement concerné.

Bien entendu, l'obtention des lignées correspondant aux substitutions optimales, quand elle est possible, peut permettre une confirmation définitive. Mais, outre que la méthode biochimique demande beaucoup moins de temps et donne simultanément des informations supplémentaires, elle peut servir ensuite à reconnaître une lignée d'addition donnée, ou la présence d'un chromosome (ou d'un fragment de chromosome) de Seigle dans un autre génome à la suite d'une substitution ou d'une translocation. Les deux méthodes, cytogénétique et biochimique, sont donc complémentaires, car l'une apporte une preuve de l'existence d'une information génétique extérieure à l'espèce considérée, tandis que l'autre renseigne sur la nature de l'élément étranger (substitution, addition ou translocation). Remarquons toutefois que la présence d'un élément étranger peut ne pas être décelable biochimiquement (par exemple : s'il est muet pour la fonction considérée) ou cytologiquement (si, par exemple, il ne perturbe pas la gamétogenèse). Un objectif est donc d'augmenter le nombre de marqueurs biochimiques utilisables pour de telles études.

Reçu pour publication en Juillet 1976.

Summary

Use of biochemical markers to identify Rye chromosomes.

The gliadins and beta-amylase electrophoregrams phenotypes of « FEC 28 » wheat, rye line 10, T 204 triticale and the series of six disomic rye chromosome additions to « FEC 28 » were determined.

Extracts were electrophoresed for the determination of the gliadins in horizontal starch gels and of the beta-amylases in horizontal polyacrylamide gels, using methods previously described (see text). The series of seven disomic *Secale cereale* L. cultivar line 10 chromosome addition to the *Triticum aestivum* L. cultivar « FEC 28 » has been developed by BERNARD (1976).

For the gliadins, it was found that the rye constituents are under the dependance of chromosome 1 R, results which are in good agreement with the SHEPHERD'S (1968, 1973) (see fig. 1). This result permits to confirm that wheat cultivars « Clément », « Benno », « Aurora » and « Kaukaz » have the chromosome 1 R (or a fragment) in their own genome because they possess the same constituents observed in the rye diagram (see fig. 2).

For beta-amylases zymograms, it seems that chromosome 5 R is implicated in the synthesis of rye isozymes (see fig. 3). So we discussed the possible part of chromosome 5 R in the triticale seed shrivelling starting from the results of DARVEY (1973).

We concluded on the complementarity of genetic and biochemical methods in the chromosome identification.

Références bibliographiques

- AURIAU P., AUTRAN J. C., CHARBONNIER L., DOUSSINAULT G., FEILLET P., GODON B., GRIGNAC P., JOUDRIER P., KOBREHEL K., KOLLER J., ROUSSET M. et RIVALLANT S., 1976. Variabilité génétique de la composition des gliadines, gluténines, bêta-amylases, alpha-estérases, peroxydases et phosphatases acides du Blé (*Triticum aestivum*). *Ann. Amélior. Plantes*, **26** (1), 51-66.
- AUTRAN J. C., 1975. Nouvelles possibilités d'identification des variétés françaises de blé par électrophorèse des gliadines du grain. *Indust. agric. alim.*, **9-10**, 1 075-1 094.
- BARBER H. N., DRISCOLL C. J. et VICKERY R. S., 1968. Enzymic markers for wheat and rye chromosomes. *Proc. 3rd Int. Wheat Genet. Symp.* Canberra, 116-122.
- BERNARD M., 1976. Étude des caractéristiques cytologiques, morphologiques et agronomiques de six lignées d'addition Blé-Seigle. *Ann. Amélior. Plantes*, **26**, 1, 67-91.
- BHATTACHARYYA N. K., EVANS L. E., JENKINS B. C., 1961. Karyotype analysis of the individual « Dakold » fall Rye chromosome additions to « Kharkov » winter wheat. *Nucleus*, **4**, 25-28.
- DARVEY N. L., 1973. Genetics of seed shrivelling in wheat and Triticale. *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, Columbia, MO., 155-159.
- GUPTA P. K., 1972. Cytogenetic evolution in the *Triticinae*: homeologous relationships. *Genetica* **43**, 504-530.
- HART G. E., 1970. Evidence for triplicate genes for alcohol dehydrogenase in hexaploid Wheat. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **66**, 1136-1141.
- IRANI B. N., BHATIA C. R., 1972. Chromosome location of alcohol dehydrogenase gene(s) in Rye using Wheat-Rye addition lines. *Genetica* **43**, 195-200.
- JOUDRIER P., BOURDET A., 1972. Aspect génétique des activités bêta-amylasiques dans le grain de blé. *Ann. Amélior. Plantes*, **22**, 263-279.
- JOUDRIER P., 1974. Spécificité génétique de la bêta-amylase chez *Triticum aestivum*: existence de cinq types variétaux de zymogrammes. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **278**, Série D, 1 777-1 780.
- JOUDRIER P., BERNARD M., 1977. Responsabilité du génome D sur certaines isozymes bêta-amylase du grain de blé tendre. *Ann. Amélior. Plantes*, **27**, (1) 35-47.
- JOUDRIER P. et CAUDERON Y., 1976. Localisation chromosomique de gènes contrôlant la synthèse de certains constituants bêta-amylasiques du grain de blé tendre. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **282**, Série D, 115-118.
- KOBREHEL K., FEILLET P., 1975. Identification of genomes and chromosomes involved in peroxidase synthesis of wheat Seeds. *Can. J. Bot.*, **53**, 20, 2 336-2 344.
- METTIN D., BLUTHNER W. D. and SCHLEGEL G., 1973. Additional evidence on spontaneous 1B/1R wheat rye substitutions and translocations. *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, Columbia, Missouri, 172-184.
- NISHIKAWA K., NOBUHARA M., 1971. Genetic studied of alpha-isozymes in wheat. I. — Location of genes and variation in tetra and hexaploid wheat. *Jap. J. Genet.* **46**, 5, 345-353.
- RILEY R., 1960. The meiotic behaviour, fertility and stability of Wheat-Rye chromosome addition lines. *Heredity*, **14**, 89-100.
- SEARS E. R., 1968. Relationships of chromosomes 2 A, 2 B, and 2 D with their Rye homeologue. *Proc. 3rd Int. Wheat Genet. Symp.* Canberra, 53-61.
- SHEALY H. E., SIMMONDS D. H., 1973. The early developmental morphology of the Triticale grain. *Proc. 6rd Int. Wheat Genet. Symp.*, Columbia, Mo., 265-270.
- SHEPHERD K. W., 1968. Chromosomal control of endosperm proteins in Wheat and Rye. *Proc. 3rd Int. Wheat Genet. Symp.*, Canberra, 86-96.
- SHEPHERD K. W., 1973. Homeology of wheat and alien chromosomes controlling endosperm phenotypes. *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, Columbia, Mo., 745-760.
- SHEPHERD K. W., JENNINGS A. C., 1971. Genetic control of rye endosperm proteins. *Experientia*, **27**, (1), 98-99.
- TANG K. S., HART G. E., 1975. Use of isozymes as chromosomes markers in Wheat-Rye addition lines and in Triticale. *Genet. Res.* **26**, 2, 187-201.
- WRIGLEY C. W., SHEPHERD K. W., 1973. Electrofocusing of grain proteins from Wheat genotypes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 154-162.
- ZELLER F. J., 1973. 1B/1R wheat-rye chromosome substitutions and translocations. *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.* Columbia, Mo., 209-221.