

Piotr Masojć

Katedra Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Szczecinie

Kierunki badań genetycznych nad skłonnością ziarniaków zbóż do przedźniwnego porastania *

Porastanie zbóż, czyli przedwczesne kiełkowanie ziarniaków w kłosach w okresie zbiorów, przynosi znaczne straty gospodarcze w skali światowej, spowodowane spadkiem wartości technologicznej i obniżeniem plonów. Mąka uzyskana z porośniętego ziarna nie nadaje się do wypieku chleba (pszenica, żyto) i wyrobu makaronów (pszenica twarda). Porośnięte ziarno jest także złym surowcem dla przemysłu piwowarskiego (jęczmień), a ponadto nie może być wykorzystane jako materiał siewny. Klimat Polski z częstymi opadami deszczu w okresie letnim oraz duży udział wrażliwych odmian żyta i pszenżyta w zasiewach zbóż decydują o corocznym ryzyku wystąpienia strat związanych z porastaniem, szacowanych na ok. 5–20% zbiorów [55].

Obserwowana u współczesnych odmian skłonność do porastania jest ubocznym efektem wieloletniej hodowli zmierzającej do wyrównania wschodów po siewie, który z reguły następuje w krótkim czasie po zbiorze. Wyeliminowano w ten sposób z materiałów hodowlanych korzystne geny warunkujące spoczynek późniwny nasion, czego przykładem mogą być łatwo porastające krajowe odmiany pszenżyta ozimego i żyta.

Hodowla odmian odpornych na porastanie natrafia na szereg trudności, z których główne to:

- 1) znalezienie odpowiednich źródeł genów odporności,
- 2) złożony i słabo poznany mechanizm genetyczny odporności na porastanie,
- 3) znaczna zmienność badanej cechy pod wpływem czynników środowiska,
- 4) brak efektywnych metod selekcji, zapewniających precyzyjną identyfikację genów odporności.

Nic dziwnego, że aktualna lista odmian zbóż o udokumentowanej dużej odporności na porastanie nie jest długa. Wzorcem odporności pszenic czerwonoziarnistych są odmiany kanadyjskie RL 4137 i Columbus, pszenic białoziarnistych – odmiany Kenya 321, AUS 1408 i Peck, jęczmienia – WM 143-2-3b, Agnet, Hiproly, żyta – szwedzka odmiana Otello [8]. Dużym sukcesem krajowej hodowli żyta było zarejestrowanie

* Praca wykonana w ramach projektu nr. 5 S 301 012 06 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Tabela 1. Cechy związane z porastaniem zbóż i ich podłoże dziedziczne

| Lp. | Cecha | Zidentyfikowane geny | Lokalizacja chromosomowa | Gatunek |
|-----|---|---|---|--|
| 1 | Zdolność kłosa do gromadzenia wody | <i>Hd, B1, B2, C, Q, S1</i> | <i>4BS, 5AL, 6BL, 2B</i> | pszenica [8, 22] |
| 2 | Budowa i skład chemiczny plew | — | — | pszenica [22], pszenżyto [10], |
| 3 | Budowa i skład chemiczny okrywy owocowo-nasiennej | <i>R1, R2, R3</i> | <i>3DL, 3AL, 3BL</i> | pszenica [11, 12, 13, 14, 16] |
| 4 | Grubość ścian komórkowych bielma i upakowanie granuli skrobiowych | — | — | jęczmień [37] |
| 5 | Głębokość i długość spoczynku późniejszego | <i>Dorm: 1, 2, 3, 4, 5</i> | <i>4., 1L, 1S, 3., 5S, 2., 7H, 1H, 5H</i> | pszenica [7, 26, 41], jęczmień [51] |
| 6 | Synteza giberelin | <i>d1, d2, d3, d5, d-2, d-18, d-11</i> | <i>2A, 5A, 2B, 2D, —</i> | kukurydza [42] ryż [36], jęczmień [24] |
| 7 | Niewrażliwość na działanie gibereliny | <i>Rht1/3, Rht2/10, ct1, ct2, D8, D9, d-1</i> | <i>4BS, 4DS, 7R, 5R, 1L, 5S</i> | pszenica [40], żyto [40], kukurydza [58], ryż [36], jęczmień [24], kukurydza [42] |
| 8 | Synteza kwasu abscysynowego | <i>vp2, vp5, vp7, vp9</i> | — | kukurydza [42] |
| 9 | Wrażliwość na działanie kwasu abscysynowego | <i>vp1</i> | — | kukurydza [42], <i>Lophopyrum elongatum</i> [41] |
| 10 | Aktywność α -amylazy | <i>α-Amy1, α-Amy2</i> | <i>6L, 7L</i> | pszenica [6], żyto [31], jęczmień [21] |
| 11 | Aktywność β -glukanazy | <i>Glb</i> | <i>3L</i> | pszenica [16, 25] |
| 12 | Aktywność α -glukozydazy | — | — | jęczmień [47] |
| 13 | Aktywność endoproteinaz | <i>Ep</i> | <i>7A, 7B, 7D</i> | pszenica [35] |
| 14 | Aktywność lipazy | — | — | pszenica, żyto, pszenżyto [17] |
| 15 | Aktywność inhibitora α -amylazy | <i>Isa-1</i> | <i>2L</i> | pszenica, żyto, jęczmień, kozieniec [18, 20, 30, 50] |
| 16 | Zawartość pentozanów | — | — | żyto [57] |

odmiany Amilo, odznaczającej się dużą liczbą opadania i pogłębionym spoczynkiem późnym. W większości ośrodków hodowli zbóż prowadzona jest systematyczna selekcja w kierunku poprawy odporności na porastanie, której efektem jest stały postęp hodowlany [5, 10, 49].

Prace badawcze zmierzające do wyjaśnienia biochemicznych, genetycznych i środowiskowych mechanizmów związanych z porastaniem prowadzone są w wielu ośrodkach światowych z dużą intensywnością. Wyrazem tego są odbywające się cyklicznie od roku 1975 międzynarodowe spotkania poświęcone wyłącznie zjawisku porastania zbóż [8].

W ostatnich latach zaznaczył się wyraźny postęp w dziedzinie identyfikacji cech i genów związanych z porastaniem (tab. 1). Odporność na sprzyjające przedwczesnemu kiełkowaniu warunki zewnętrzne uzależniona jest od złożonego zespołu czynników obejmującego cechy morfologiczno-anatomiczne, fizjologię rozwoju i dojrzewania ziarniaka oraz biochemię.

Na porastanie narażone są szczególnie odmiany wczesne, których czas pozostawania w polu po dojrzaniu jest z reguły dłuższy niż odmian późniejszych. Z tego względu odmiany wczesne powinny odznaczać się dłuższym okresem spoczynku, co w praktyce hodowlanej jest trudne do osiągnięcia. Sam proces selekcji w kierunku zwiększenia odporności na porastanie prowadzony bez kontroli daty kwitnienia lub fazy dojrzałości roślin, eliminuje z populacji formy wczesne, doprowadzając do opóźnienia dojrzewania. Przykładem może tu być żyto odmiany Otello, którego duża odporność na porastanie wynika po części z opóźnionego dojrzewania.

Budowa i pozycja kłosa, stopień okrywania ziarna przez plewy mają istotny wpływ na dostęp wody opadowej do ziarniaka. Kłosa pszenicy pozbawione ości wchłaniają mniej wody niż kłosa ościste [22]. Ościstość jest warunkowana przez geny *Hd*, *B1* i *B2* położone odpowiednio na chromosomach *4BS*, *5AL* i *6BL* [8]. Kłosa pochylony, o dużych i ściśle przylegających plewach pokrytych nalotem woskowym może w znacznym stopniu ograniczyć dostęp wody do ziarniaków. W przypadku krótkotrwałych, lecz powtarzających się opadów deszczu, ważna jest także zdolność do szybkiego wysychania kłosów, która może być różna w zależności od typu kłosa [8]. Kłosa typu "club" o genotypie *CQS1* mają ściśle upakowane kłosa, które dłużej przetrzymują wodę [8].

W wielu pracach zaobserwowano, że energia kiełkowania świeżo zebranego ziarna jest w szalkach Petriego większa niż bezpośrednio w kłosie [10]. Jedną z przyczyn może być ograniczenie dostępu tlenu do zarodka w oplewionych ziarniakach. Plewy mogą także działać hamująco na kiełkowanie dzięki obecności w nich inhibitorów kiełkowania (kwasy fenolowe, katechotanniny, kwas abscysynowy i inne), które w warunkach uwodnienia dyfundują do ziarniaka [8]. Interesujące dla hodowli byłoby zbadanie zakresu zróżnicowania genetycznego pod względem składu, jak i zawartości tych inhibitorów.

W ograniczaniu penetracji wody i tlenu do zarodka dużą rolę odgrywa budowa i skład chemiczny okrywy owocowo-nasiennej [8]. Wiadomo od dawna, że obecność czerwonego pigmentu w ziarnie pszenicy podwyższa jej odporność na porastanie. Czerwona barwa pszenicy jest uwarunkowana allelami *R*, zlokalizowanymi na długich ramionach chromosomów 3*A*, 3*B* i 3*D* [16]. Jak wykazały badania Flinthama, liczba alleli *R* u czerwonoziarnistych odmian pszenic nie zawsze osiąga maksymalną wartość 6 [13, 14]. Ze względu na addytywne działanie poszczególnych alleli *R*, poprawę odporności na porastanie można osiągnąć przez eliminację z odmian niekorzystnych alleli recesywnych *r*, warunkujących barwę białą. Szeroko zakrojone prace genetyczno-hodowlane zmierzające do zwiększenia liczby alleli kodujących czerwoną barwę ziarna pszenicy prowadzone są w Wielkiej Brytanii [14]. Z kolei hodowcy australijscy wykazali istnienie niezależnego od barwy ziarniaka mechanizmu genetycznego, warunkującego odporność na porastanie u pszenic białoziarnistych [4, 7, 27]. Wyselekcjonowane linie nie zawierające allela *R* przewyższały pod względem odporności na porastanie niektóre odmiany czerwonoziarniste [28, 34].

Powierzchnia ziarniaka może zawierać liczne pofałdowania, bruzdy i pęknięcia w znacznym stopniu ułatwiające dostęp wody lub tlenu do zarodka i bielma. O znaczeniu szczelności okrywy owocowo-nasiennej w utrzymywaniu stanu spoczynku ziarna świadczą wyniki licznych eksperymentów z nakłuwaniem lub nacinaniem jego powierzchni [55]. Stwierdzono również znaczną zmienność ziarniaków pod względem grubości okrywy [11], a także ilości substancji woskowych [12]. W okrywach nasiennych znajdują się inhibitory kiełkowania, za które uważa się kwasy fenolowe, katechotaniny, kwas abscysynowy oraz krótkie, nasycone kwasy tłuszczowe [46, 56]. Mechanizmy genetyczne decydujące o zróżnicowaniu ilościowym tych związków nie są znane.

Kwas abscysynowy (ABA), którego stężenie w ziarnie wzrasta do momentu uzyskania dojrzałości pełnej, reguluje przemiany metaboliczne prowadzące do spoczynku nasion. Mutanty pozbawione tego hormonu, znane u *Arabidopsis* (*aba*) czy kukurydzy (*vp2*, *vp5*, *vp7*, *vp9*), nie osiągają stanu spoczynku, a ich ziarniaki kiełkują bez przeszkód jeszcze na roślinach matecznych [42]. Przejawiająca się w podobny sposób mutacja genu *vp1* wywołuje utratę wrażliwości ziarna na ABA, mimo że synteza hormonu odbywa się normalnie [41, 42]. U mutantów *vp1* blokowana jest także synteza barwników antocyjanowych w ziarnie. Zarówno u pszenicy [2, 52], jak i żyta [33] stwierdzono istotną zależność między odpornością na porastanie a wrażliwością ziarna na ABA. Nie jest natomiast jasne, czy zróżnicowanie odmian pod względem zawartości ABA ma związek z długością okresu spoczynku [52]. Kwas abscysynowy pobudza zarówno w bielmie, jak i w zarodku syntezę wielu białek specyficznych dla stanu spoczynku [41]. U pszenicy zidentyfikowano geny *Dorm1-5* zlokalizowane na chromosomach 4., 1., 3., 5. i 2., których produkty białkowe obecne są w znacznych ilościach w pęczniejących ziarniakach spoczynkowych [41].

Wśród polipeptydów, których synteza jest indukowana przez ABA, szczególne zainteresowanie wzbudził inhibitor endogennej alfa-amylazy (ISA-1) obecny w bielmie pszenicy, jęczmienia, żyta i pszenżyta [30]. Białko to odznacza się zdolnością do tworzenia kompleksów z alfa-amylazą syntetyzowaną w trakcie porostania, co w efekcie obniża aktywność katalityczną enzymu. Stwierdzono znaczną zmienność zawartości inhibitora w ziarnie, jak również dość duży polimorfizm izoenzymatyczny tego białka [30]. Chociaż próby podwyższenia liczby opadania mąki pszennej lub żytniej przez dodanie do niej oczyszczonego inhibitora przyniosły pozytywne rezultaty [50], to jednak efektywność oddziaływania tego białka na alfa-amylazę w porastającym ziarnie, w świetle ostatnich badań, wydaje się niewielka [20].

Działające antagonistycznie w stosunku do ABA gibereliny (GA) hamują ekspresję genów związanych z rozwojem lub spoczynkiem, aktywując geny decydujące o przejściu ziarna do fazy kiełkowania [24, 42]. Porostanie ziarna jest poprzedzone syntezą i sekrecją giberelin z zarodka do otaczających go tkanek, w tym warstwy aleuronowej [6]. U kukurydzy i ryżu zidentyfikowano szereg genów warunkujących syntezę giberelin [36, 42]. Wiele linii karłowych i półkarłowych wykorzystywanych w hodowli nosi w sobie zmutowane allele tych genów [36]. Bardzo cenne dla hodowców są również geny wywołujące zmniejszoną wrażliwość roślin na gibereliny, które wykryto u pszenicy [15], żyta [40], jęczmienia [24], kukurydzy [58] i ryżu [36]. Geny *Rht1* i *Rht2* rozpowszechnione są w wielu programach hodowlanych pszenic krótkosłomych. Allel *Rht3*, mimo iż warunkuje dużą odporność na porostanie, nie znalazł zastosowania w hodowli ze względu na związane z nim zbyt silne skrócenie źdźbła [15]. Dla potrzeb hodowli odmian odpornych na porostanie najbardziej przydatny byłby allel silnie ograniczający wrażliwość warstwy aleuronowej na giberelinę, mający jednak mniejszy wpływ na wzrost rośliny.

Jednym z pierwszych przejawów kiełkowania jest pobudzona przez gibereliny intensywna synteza alfa-amylazy zachodząca początkowo głównie w tarczce zarodka, a później w warstwie aleuronowej [24]. Molekularny mechanizm działania gibereliny na geny strukturalne alfa-amylazy jest w dużej mierze poznany dzięki badaniom sekwencji promotorowych z warstwy aleuronowej jęczmienia, ryżu i pszenicy [43]. W sekwencji promotora genu alfa-amylazy zlokalizowane są odcinki tworzące razem centrum *GARC*, rozpoznające sygnał indukowany przez gibereliny. Sygnał ten jest przekazywany przez białko regulatorowe wykazujące silne powinowactwo do struktury *GARC*. Utworzenie kompleksu białka regulatorowego z promotorem genu strukturalnego alfa-amylazy uruchamia bardzo intensywny proces transkrypcji i translacji, w efekcie którego ilość enzymu w kiełkującym ziarniaku może wzrosnąć ponad tysiąckrotnie [6, 47]. Synteza alfa-amylaz jest także regulowana negatywnie przez ABA dzięki obecności sekwencji *ABRC* w odcinku promotora [43]. Poziom ekspresji genów strukturalnych alfa-amylazy zależy zatem od stosunku ilościowego giberelin i ABA. Odwrotnej regulacji (pobudzanie przez ABA i hamowanie przez giberelinę) podlegają odcinki promotorowe genów aktywnych w ziarnie spoczynkowym, np. gen

inhibitora alfa-amylazy [30]. Polimorfizm genów kodujących białkowy czynnik transkrypcyjny dla alfa-amylaz jest przypuszczalnie jedną z głównych przyczyn zróżnicowania odmian pod względem odporności na porastanie.

Geny strukturalne alfa-amylazy zbóż tworzą trzy rodziny zlokalizowane na różnych chromosomach [31]. Intensywna ekspresja genów α -Amy1, należących do długich ramion chromosomów grupy 6., z reguły doprowadza do obniżenia jakości ziarna [8, 21]. U pszenicy stwierdzono trzy niezależne mechanizmy syntezy izoenzymów α -AMY1 [13]. Najczęściej spotykany jest mechanizm powiązany z kiełkowaniem dojrzałych ziarniaków po ustąpieniu stanu spoczynku. U niektórych odmian alfa-amylaza tej grupy może się także pojawić w dużych ilościach podczas dojrzewania mimo braku jakichkolwiek oznak porastania [29]. Trzeci przypadek to spontaniczne kiełkowanie w kłosie jeszcze zielonych, niedojrzałych ziarn. Druga pod względem aktywności rodzina α -Amy2 jest zlokalizowana na długich ramionach chromosomów grupy 7. [8, 31]. Izoenzymy α -AMY2 są syntetyzowane głównie w okrywie owocowej rozwijającego się ziarniaka, po czym w miarę dojrzewania zanikają. Do ich syntezy dochodzi także podczas kiełkowania, jednak w znacznie mniejszych ilościach niż grupy α -AMY1 [21]. Rodzina genów α -Amy3, odkryta stosunkowo niedawno na chromosomach grupy 5., odgrywa zdecydowanie najmniejszą rolę, podlegając ekspresji w początkowej fazie rozwoju ziarniaka [3]. Liczbę sprzężonych ze sobą genów w najistotniejszej dla porastającego ziarna rodzinie α -Amy1 ocenia się na 3 u żyta [31] i ryżu [48], 7 u jęczmienia [21] i 12–14 u pszenicy i pszenżyta [21]. Badania nad polimorfizmem alfa-amylaz u odmian uprawnych żyta i pszenżyta sugerują brak alleli *null* w loci α -Amy1. Wprowadzenie takich alleli do odmian uprawnych mogłoby doprowadzić do obniżenia aktywności alfa-amylazy.

Alfa-amylazy syntetyzowane podczas kiełkowania głównie w komórkach warstwy aleuronowej są wydzielane do bielma, którego komórki magazynują skrobię w postaci granuli skrobiowych. Grube i trwałe ściany komórek bielma oraz ściśle upakowanie granuli skrobiowych i białkowych mogą stanowić barierę znacznie opóźniającą penetrację alfa-amylaz do wnętrza ziarniaka. Dobrą ilustracją jest tu mutant M-737 jęczmienia odmiany Minerva, którego bielmo ma cieńsze ściany i luźniejszy układ komórek, dzięki czemu rozkład substancji zapasowych jest bardzo szybki [37]. Badania histologiczne ziarna wykazały również, że obecność nekroz w sąsiedztwie warstwy aleuronowej sprzyja dyfuzji alfa-amylazy do wnętrza bielma [20].

Efektywność rozkładu skrobi zmagazynowanej w bielmie przez alfa-amylazy może być zwiększona dzięki działaniu kilku innych enzymów syntetyzowanych *de novo* podczas kiełkowania. Beta-glukanaza i xylanazy, rozkładające ściany komórkowe złożone z arabinoksydanu i beta-glukanu, ułatwiają alfa-amylazie penetrację bielma [6, 25]. Natomiast alfa-glukozydaza, rozkładająca maltozę do reszt glukozy, działa synergistycznie w stosunku do alfa-amylazy [47]. Z kolei enzymy lipolityczne, których poziom w porastającym ziarnie jest skorelowany z aktywnością alfa-amylazy, wpływają negatywnie na przechowywanie mąki [17]. Jakość produktów zbożowych

ulega także pogorszeniu w wyniku związanej z porastaniem syntezy endoproteinaz hydrolizujących białka zapasowe i oksydazy polifenolowej, której aktywność powoduje ciemnienie niektórych typów makaronów [23, 35]. Obniżenie aktywności tych enzymów lub opóźnienie ich syntezy byłoby pożądane z punktu widzenia hodowli odmian odpornych na porastanie. U żyta stwierdzono wysoce istotną korelację liczby opadania i zawartości pentozanów [57]. Duża zawartość tych związków wchodzących w skład ścian komórkowych wpływa korzystnie na wartość wypiekową, może także ograniczać hydrolizę skrobi w porastającym ziarnie.

Analiza złożonego i nie do końca poznanego systemu czynników, których wypadkowe działanie wraz ze zmiennymi warunkami środowiska decyduje o odporności odmiany na porastanie, prowadzi do wniosku, że dziedziczenie tej cechy jest bardzo złożone. Potwierdzają to wyniki badań genetycznych przeprowadzonych u mieszańca jęczmienia Steptoe/Morex, przy wykorzystaniu markerów molekularnych [51]. W genomie jęczmienia wyróżniono 27 loci rozrzuconych na wszystkich siedmiu chromosomach, które w istotny sposób wpływały na spoczynek nasion. Efekty poszczególnych loci nie były jednakowe. Największe znaczenie dla wykształcenia odporności na porastanie miał locus z chromosomu 7., a następnie trzy loci z chromosomów 1., 5. i 7. Efekty pozostałych genów były niewielkie. Wielu autorów donosi także o wielogenowym dziedziczeniu odporności na porastanie u żyta [44, 54] i pszenicy [34], szacując jego odziedziczalność na 0,4–0,7. Z drugiej strony, badania nad niektórymi mieszańcami sugerują prosty model dziedziczenia skłonności do porastania. I tak, w krzyżówkach między pszenicami białoziarnistymi dziedziczenie spoczynku nasion dobrze opisywał model dwugenowy przy założeniu recesywności badanej cechy [4]. U pszenic czerwonoziarnistych segregowały także dwa niezależne geny, lecz spoczynek był cechą dominującą [27]. Jeden lub dwa recesywne geny odpowiadały za dużą aktywność alfa-amylazy niezależną od widocznego porastania u mieszańców z udziałem pszenicy odmiany Spica [13, 29]. Natomiast u mieszańców międzyliniowych żyta wykryto obecność dwóch niezależnych genów duplikatywnych, których allele recesywne warunkowały wystąpienie dużej aktywności alfa-amylazy [32]. Analizę genetyczną odporności na porastanie może utrudniać występowanie chimeryzmu genetycznego tkanek ziarniaka. Podczas gdy zarodki zawierają parę alleli rodzicielskich w pojedynczej dawce (Aa), to triploidalne bielmo ma podwójną dawkę genów matecznych (AAa), a owocnia tylko geny mateczne (AA).

Powyższy przegląd wyników badań genetycznych sugeruje, że w dziedziczeniu odporności na porastanie bierze udział zespół loci złożony z niewielkiej liczby genów głównych i licznych genów o mniejszym znaczeniu, które działają modyfikująco. Przykładem genów głównych są allele *R* kodujące czerwoną barwę ziarniaka pszenicy lub allele warunkujące dużą aktywność alfa-amylazy u żyta. Wpływają one także decydująco na spoczynek nasion, liczbę opadania, wrażliwość ziarna na ABA, o czym świadczą wysoce istotne korelacje między cechami związanymi z porastaniem [30, 33]. Obserwowane zależności mogą wynikać z plejotropowego oddziaływania nie-

których genów, czego dobrym przykładem jest allel *vp1*, decydujący o niewrażliwości na ABA i o braku zabarwienia antocyjanowego ziarna kukurydzy [42]. W zależności od materiału badawczego zestaw genów głównych kontrolujących odporność na porastanie może być różny. I tak, u karłowatej pszenicy z genem niewrażliwości na giberelinę *Rht3* silne plejotropowe efekty tego allele zabezpieczają rośliny przed porastaniem [15]. Odmienny jest także mechanizm genetyczny odporności na porastanie u pszenic biało- i czerwonoziarnistych [7, 27].

McCaig i De Pauw [34] stwierdzili, że linie wywodzące się z mieszańca między dwoma nie porastającymi odmianami miały większą odporność od linii wyprowadzonych z krzyżówek z udziałem tylko jednego odpornego rodzica. W hodowli należy zatem dążyć do zgromadzenia w materiałach wyjściowych różnorodnych źródeł genów odporności. Odpowiedni plan krzyżowań oraz precyzyjna selekcja materiałów mieszańcowych powinny doprowadzić do połączenia w jednej odmianie kilku mechanizmów genetycznych zabezpieczających spoczynek późniwny nasion i umożliwić wyodrębnienie rekombinantów transgresyjnych, przewyższających odpornością formy rodzicielskie. Dobrym przykładem rozszerzenia bazy genów odporności na porastanie są próby przeniesienia tej cechy z dzikich gatunków żyta, *Secale silvestre* lub *Secale vavilovii*, do odmian uprawnych [39, 45]. Biorąc pod uwagę złożoność podłoża dziedzicznego, hodowla odmian odpornych na porastanie nie może ograniczać się do stosowania tylko jednej metody selekcji, którą w praktyce najczęściej jest badanie porastania w kłosach lub test zdolności kiełkowania. Przegląd kryteriów selekcji wykorzystywanych przy poszukiwaniu korzystnych genów i ich kombinacji przedstawia tabela 2.

Bezpośrednia identyfikacja alleli sprzyjających odporności na porastanie jest w praktyce hodowlanej utrudniona ze względu na dużą zmienność cechy pod wpływem czynników środowiska i konieczność pracochłonnej oceny potomstwa. Wydaje się, że większą efektywność selekcji będzie można osiągnąć po znalezieniu pozycji genów decydujących o porastaniu na konstruowanych obecnie w wielu ośrodkach szczegółowych mapach molekularnych chromosomów zbóż [9, 51]. Szkielet map molekularnych tworzą loci identyfikowane prostymi i niezależnymi od wpływów środowiska technikami wykorzystującymi polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) czy polimorfizm izoenzymatyczny [9]. Dzięki szeroko dziś stosowanym programom komputerowym typu MAPMAKER-QTL czy QTL-STAT jest możliwe umieszczenie na mapach molekularnych również genów decydujących o cechach mierzalnych, do jakich należy odporność na porastanie. Pozwoli to na identyfikację loci markerowych (RFLP lub PCR), silnie sprzężonych z genami regulującymi porastanie, które następnie mogą być wykorzystane do selekcji pożądanych genotypów. Pierwsze markery molekularne typu RFLP dla genów związanych z porastaniem zidentyfikowano już u pszenicy [1, 16] i jęczmienia [51]. Obserwowany w ostatnich latach szybki proces rozbudowywania map molekularnych ważniejszych gospodarczo gatunków powinien w krótkim czasie doprowadzić do zlokalizowania większości loci kontrolujących porastanie.

Tabela 2. Ważniejsze metody badawcze służące ocenie odporności zbóż na porastanie

| Lp. | Metoda | Charakterystyka metody | Wykorzystanie w hodowli |
|-----|--|---|--|
| 1 | Określenie procentowej zawartości ziarn porośniętych w kłosach pozostawionych dłużej w polu. | Umożliwia ocenę porastania w warunkach naturalnych. Zawodzi w razie braku opadów. Słaba powtarzalność w latach. | Jedna z pierwszych metod stosowanych przez hodowców. Obecnie rzadziej używana [8, 34]. |
| 2 | Określenie procentowej zawartości ziarn porośniętych w kłosach poddanych deszczowaniu w komorze cieplnej. | Bardzo skuteczna i prosta metoda prowokacyjna, wykazująca dobrą powtarzalność w latach. | Standardowo stosowana we współczesnej hodowli [19, 34]. |
| 3 | Badanie długości i głębokości spoczynku nasion przez ocenę zdolności kiełkowania ziarna w szalkach Petriego. | Analiza energii kiełkowania ziarna w kilku terminach po zbiorze pozwala ocenić dynamikę wychodzenia ze stanu spoczynku. | Często stosowana w hodowli [26, 34, 38]. |
| 4 | Ocena liczby opadania metodą Hagberga-Pertena. Pozwala określić lepkość kleiku skrobiowego uzyskanego z mąki lub śruty, która zależy od aktywności alfa-amylazy, budowy granul skrobiowych, a w przypadku żyta – także od zawartości pentozanów. | Pozwala pośrednio ocenić wartość wypiekową mąki, która mimo braku widocznego porastania może być słaba ze względu na tzw. ukryte porastanie. Metoda bardzo wrażliwa na zmienność warunków pogodowych w czasie dojrzewania ziarna. | Standardowa metoda oceny porastania ukrytego, powszechnie stosowana w hodowli i przy ocenie jakościowej ziarna [54, 57]. |
| 5 | Metoda amylograficzna. Określa lepkość kleiku skrobiowego, właściwości skrobi i białek. | Bardzo czuła i stabilna metoda, pozwalająca ocenić straty jakościowe wynikające z porastania. Jej wadą jest zużywanie dużej ilości materiału. | Obecnie rzadziej stosowana w hodowli [8, 57]. |
| 6 | Bezpośrednia ocena aktywności alfa-amylazy w ziarnie, dokonywana przy użyciu różnorodnych metod kolorymetrycznych, dyfuzji w żelu agarozowym itp. | Umożliwia prowadzenie selekcji zmierzającej do obniżenia aktywności alfa-amylazy. Ponieważ nie wymaga większych ilości materiału, może być stosowana we wczesnym etapie hodowli. | Często wykorzystywana w pracach genetycznych i w praktycznej hodowli [13, 29, 33]. |

| Lp. | Metoda | Charakterystyka metody | Wykorzystanie w hodowli |
|-----|---|---|--|
| 7 | Określanie wrażliwości na gibberelinę jako skrócenie długości siewek rosnących w roztworze GA ₃ . | Umożliwia identyfikację genów warunkujących brak wrażliwości na GA, które mogą być wykorzystane dla zwiększenia odporności na porastanie. | Stosowana raczej w badaniach genetycznych [24, 36, 40]. |
| 8 | Ocena wrażliwości na kwas abscysynowy, wyrażonej hamowaniem kiełkowania lub ograniczeniem syntezy alfa-amylazy. | Umożliwia identyfikację genów warunkujących zwiększenie wrażliwości na ABA, a tym samym poprawę odporności na porastanie. | Badana jest przydatność tej metody w hodowli odmian pszenicy i żyta odpornych na porastanie [2, 33, 52]. |
| 9 | Ocena barwy ziarna w roztworze NaOH. | Służy identyfikacji genów <i>R</i> i ich liczby w odmianach pszenic czerwonych. | Stosowana w programie brytyjskim poprawy odporności na porastanie odmian pszenicy czerwonej [14]. |

Sukcesy w transformacji roślin uprawnych, w tym zbóż [53], prowadzące do rozwoju nowej dyscypliny zwanej hodowlą molekularną, w niedługim czasie pozwolą na korzystanie z niekonwencjonalnych strategii w celu rozwiązywania problemów związanych z porastaniem. Pierwszym etapem tych prac jest rozpoczęte już w wielu ośrodkach klonowanie ważniejszych genów kodujących odporność na porastanie – takich jak np. geny czerwonej barwy, syntezy ABA, podwyższonej wrażliwości na ABA, czy gen endogenego inhibitora alfa-amylazy. Wprowadzenie każdego z wymienionych genów w podwyższonej dawce do odmiany uprawnej powinno zaowocować ograniczeniem przedwczesnej syntezy alfa-amylazy i pogłębieniem spoczynku nasion. Innym sposobem okresowego zmniejszenia aktywności alfa-amylazy jest wprowadzenie genu kodującego antysensowny mRNA enzymu, który mógłby nagromadzić się w warstwie aleuronowej w czasie rozwoju i dojrzewania ziarna. Możliwe jest także przeprogramowanie sposobu regulacji syntezy inhibitora alfa-amylazy przez połączenie sekwencji kodującej tego genu z odcinkiem promotora genu alfa-amylazy [18]. Zawierające taki gen hybrydowy porastające ziarno wraz z rozpoczęciem syntezy alfa-amylazy syntetyzowałoby także w dużych ilościach jej naturalny inhibitor, skutecznie obniżający aktywność enzymu. Ziarno takie byłoby ponadto źródłem białka inhibitora wykorzystywanego w przemyśle piekarskim [50].

Podsumowanie

W wielu ośrodkach badawczych na świecie trwają prace zmierzające do wyjaśnienia podstaw genetycznych zjawiska porastania przedżniwnego ziarniaków zbóż. W toku tych badań zidentyfikowano szereg genów regulujących syntezę giberelin i kwasu abscysynowego, aktywność alfa-amylazy i długość okresu spoczynku, a także wrażliwość ziarna na bodźce hormonalne. Wyjaśniono w dużej części molekularny mechanizm regulacji transkrypcji genów strukturalnych alfa-amylazy przez gibereliny i kwas abscysynowy. Niektóre z genów związanych z porastaniem zmapowano na chromosomach pszenicy, jęczmienia i żyta. Mimo znacznego postępu prac nad wyjaśnieniem dziedzicznego podłoża porastania wiedza o tym złożonym zjawisku jest nadal niekompletna. Nie wyjaśnione pozostają, między innymi, mechanizmy warunkujące stan spoczynku nasion, przedwczesną syntezę alfa-amylazy, zachodzącą mimo braku oznak porastania, czy też odporność na porastanie związaną z czerwoną barwą ziarniaka.

Dokonane w ostatnich latach wysiłkiem wielu zespołów badawczych znaczne rozszerzenie wiedzy o dziedzicznym aspekcie porastania uzmysławia złożoność problemu, przed jakim nadal stoją hodowcy zmierzający do poprawy wartości technologicznej ziarna zbóż. Skuteczność ich działania będzie w dużej mierze zależeć od dalszego postępu prac genetycznych uwzględniających biotechnologię oraz identyfikację nowych źródeł genów odporności na porastanie, a także od opracowania bardziej efektywnych metod selekcji.

Literatura

- [1] Anderson J.A., Sorrells M.E., Tanksley S.D. 1993. RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to preharvest sprouting in wheat. *Crop Sci.* 33: 453–459.
- [2] Basra A.S., Gill K.S., Bagga P.S., Dhaliwal H.S. 1993. Abscisic acid responsiveness and control of germinability in wheat genotypes. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 83–90.
- [3] Baulcombe D.C., Huttly A.K., Martienssen R.A., Barker R.F., Jarvis M.G. 1987. A novel wheat α -amylase gene (α -Amy3). *Mol. Gen. Genet.* 209: 33–40.
- [4] Bhatt G.M., Ellison F.W., Mares D.J. 1983. Inheritance studies in dormancy in three wheat crosses. In: Third International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals. J.E. Kruger and D.E. La Berge, eds. Westview Press, Boulder, CO, USA: 274–278.
- [5] Bichoński A. 1995. Ocena wybranych cech technologicznych z kolekcji pszenicy ozimej. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 194: 131–138.
- [6] Corder A.M., Henry R.J. 1989. Carbohydrate-degrading enzymes in germinating wheat. *Cereal Chem.* 66: 435–439.
- [7] De Pauw R.M., McCaig T.N. 1983. Evidence for a genetic mechanism controlling seed dormancy independent of seed colour. In: Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp. Kyoto, Japan: 629–633.
- [8] Derera N.F. 1989. Preharvest Field Sprouting in Cereals. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

- [9] Devos K., Gale M.D. 1993. The genetic maps of wheat and their potential in plant breeding. *Outlook on Agriculture* 22: 93–99.
- [10] Doliński R. 1995. Ocena polskich odmian uprawnych i rodów hodowlanych heksaploidalnego ozimego pszenżyta pod względem odporności na porastanie. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 195/196: 147–158.
- [11] Evers A.D. 1990. Grain morphology in the sprouting context. In: Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals, K. Ringlund, E. Mosleth, D.J. Mares eds., Westview Press/Boulder, San Francisco, Oxford. 57–64.
- [12] Evers A.D., Kratochvil J. 1993. The role of a novel embryo-cavity wax in preventing sprouting. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 185–194.
- [13] Flintham J.E. 1990. Sprouting risks and genetics strategies for breeding resistant wheats. In: Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals, K. Ringlund, E. Mosleth, D.J. Mares eds., Westview Press/Boulder, San Francisco, Oxford: 176–182.
- [14] Flintham J.E. 1993. Grain color and sprout-resistance in wheat. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 30–36.
- [15] Flintham J.E., Gale M.D. 1982. The Tom Thumb dwarfing gene Rht3 in wheat, I. Reduced pre-harvest damage to breadmaking quality. *Theor. Appl. Genet.* 62: 121–126.
- [16] Flintham J.E., Humphray S.J. 1993. Red coat genes and wheat dormancy. In: P.S. Kettlewell, J.R. Garstang, C.M. Duffus, N. Magan, W.T.B. Thomas, N.D. Paveley eds., Cereal Quality III, Aspects of Applied Biology 36, The Association of Applied Biologists, Wellesbourne, Warwick U.K.: 135–141.
- [17] Fretzdorff B. 1990. Lipolytic enzyme activities in germinating wheat, rye and triticale. In: Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals, K. Ringlund, E. Mosleth, D.J. Mares eds., Westview Press/Boulder, San Francisco, Oxford: 270–277.
- [18] Henry R.J., McKinnon G.E., Haak I.C., Brennan P.S. 1990. Use of α -amylase inhibitors to control sprouting. In: Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals, K. Ringlund, E. Mosleth, D.J. Mares eds., Westview Press/Boulder, San Francisco, Oxford: 232–235.
- [19] Hucl P. 1994. Repeatability of a simplified method for determining sprouting resistance in wheat. *Plant Variet. Seeds* 7: 79–84.
- [20] Kanzaki K., Kawabata C., Noda K. 1993. Localization of α -amylase and its inhibitor in germinating wheat seed. *Seed Science Res.* 3: 287–292.
- [21] Khursheed B., Rogers J.C. 1988. Barley α -amylase genes. Quantitative comparison of steady-state mRNA levels from individual members of the two different families expressed in aleurone cells. *J. Biol. Chem.* 263: 18953–18960.
- [22] King R.W., Lcis I. 1990. Designing wheat ears to reduce sprouting. In: Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals, K. Ringlund, E. Mosleth, D.J. Mares eds., Westview Press/Boulder, San Francisco, Oxford: 27–33.
- [23] Kruger J.E. 1993. The relationships between α -amylase and polyphenol oxidase activities in wheat. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 455–462.
- [24] Kusaba M., Kobayashi O., Yamaguchi I., Takahashi N., Takeda G. 1991. Effect of gibberellin on genetic variations in α -amylase production in germinating barley seeds. *J. Cereal Sci.* 14: 151–160.
- [25] Lai D.M., Slade A.M., Fincher G.B. 1993. Development and regulation of (1→3, 1→4)- β -glucan endohydrolases in germinating wheat (*Triticum aestivum*). *Seed Science Res.* 3: 65–73.
- [26] Larsson S. 1987. Selection for seed dormancy by using germination tests. In: Fourth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals. D.J. Mares, ed. Westview Press, Boulder, CO, USA: 400–407.
- [27] Mares D.J. 1993. Genetic studies of sprouting tolerance in red and white wheats. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 21–29.

- [28] Mares D.J., Ellison F.W. 1990. Dormancy and pre-harvest sprouting tolerance in white-grained and red-grained wheats. In: Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals, K. Ringlund, E. Mosleth, D.J. Mares eds., Westview Press/Boulder, San Francisco, Oxford: 75–81.
- [29] Mares D.J., Mrva K., Panozzo J.F. 1994. Characterization of the high α -amylase levels in grain of the wheat cultivar BD 159. *Aust. J. Agric. Res.* 45: 1003–1011.
- [30] Masojć P. 1993. Polimorfizm genetyczny i zmienność ilościowa inhibitora endogennej alfa-amylazy w ziarnie zbóż. *Zeszyty Naukowe Akad. Roln. Szczecin*, Seria rozprawy 153: 1–83.
- [31] Masojć P., Gale M.D. 1991. α -Amylase structural genes in rye. *Theor. Appl. Genet.* 82: 771–776.
- [32] Masojć P., Larsson-Rażnikiewicz 1991. Genetic variation of α -amylase levels among rye (*Secale cereale* L.) kernels, tested by gel diffusion technique. *Swedish J. Agric. Res.* 21: 141–145.
- [33] Masojć P., Stojatowski P., Łapiński M., Milczarski P. 1995. Wrażliwość na egzogenne regulatory wzrostu a odporność na porastanie odmian, linii i mieszańców żyta ozimego. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 195/196: 341–349.
- [34] McCaig T.N., De Pauw R.M. 1992. Breeding for preharvest sprouting tolerance in white-seed-coat spring wheat. *Crop Sci.* 32: 19–23.
- [35] McMaster G.J., Tomlinson D., Edwards R., Ross A., Moss H.J. 1990. Endoprotease activity in rain-damaged australian wheats. In: Fifth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals, K. Ringlund, E. Mosleth, D.J. Mares eds., Westview Press/Boulder, San Francisco, Oxford: 65–74.
- [36] Mitsunaga S., Tashiro T., Yamaguchi J. 1994. Identification and characterization of gibberellin-insensitive mutants selected from among dwarf mutants of rice. *Theor. Appl. Genet.* 87: 705–712.
- [37] Munck L. 1987. The control of pre-harvest sprouting in cereals for seed, malting and milling. In: Fourth International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals. D.J. Mares, ed. Westview Press, Boulder, CO, USA: 176–187.
- [38] Oda S., Seiko H. 1993. Evaluation of pre-harvest sprouting resistance in wheat using germination tests conducted at two temperatures. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 69–75.
- [39] Plarre W. 1980. Breeding methods for rye with resistance to sprouting. *Cer. Res. Comm.* 8: 265–274.
- [40] Plaschke J., Korzun V., Koebner R.M.D., Borner A. 1995. Mapping the GA₃-insensitive dwarfing gene ct1 on chromosome 7 in rye. *Plant Breed.* 114: 113–116.
- [41] Rayfuse L.M., Cadle M.M., Goldmark P.J., Anderberg R.J., Walker-Simmons M.K., Jones S.S. 1993. Chromosome location of ABA-inducible genes associated with seed dormancy in wheat. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 129–135.
- [42] Reid J.B. 1993. Plant hormone mutants. *J. Plant Growth Regul.* 12: 207–226.
- [43] Rogers J.C., Rogers S.W. 1992. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid cis-acting hormone response complexes. *The Plant Cell* 4: 1443–1451.
- [44] Rzepka D. 1981. Próba oceny dziedziczenia się aktywności alfa-amylazy u żyta. *Zesz. Nauk. Akad. Roln. Szczecin Roln.* XXV Ser. Agrot. 88: 243–251.
- [45] Rzepka D. 1992. Aktywność alfa-amylazy w ziarnie mieszańców żyta (*Secale cereale* x *S. vavilovii* Gross). *Hod. Rośl. Aklim. Nas.* 36: 7–15.
- [46] Seshu D.V., Dadlani M. 1991. Mechanism of seed dormancy in rice. *Seed Sci. Res.* 1: 187–194.
- [47] Sun Z., Henson C.A. 1991. A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, β -amylase, debranching enzyme and α -glucosidase in starch degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 298–305.
- [48] Sutliff T.D., Huang N., Litts J.C., Rodriguez R.L. 1991. Characterization of an α -amylase multigene cluster in rice. *Plant Mol. Biol.* 16: 579–591.
- [49] Szelağ B., Maćkowiak W., Szelağ J., Pajzert K. 1995. Postęp w odporności pszenżyta ozimego na porastanie w hodowli małyżyńskiej. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 195/196: 137–146.
- [50] Torronen A., Leisola M., Haarasilta S. 1992. Inhibition of rye α -amylase activity by barley α -amylase inhibitor. *Cereal Chem.* 69: 355–358.

- [51] Ullrich S.E., Hayes P.M., Dyer W.E., Blake T.K., Clancy J.A. 1993. Quantitative trait locus analysis of seed dormancy in "Steptoe" barley. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 136–145.
- [52] Walker-Simmons M. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol.* 84: 61–66.
- [53] Weeks J.T., Anderson O.D., Blechl A.E. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* 102: 1077–1084.
- [54] Wehmann F., Geiger H.H., Looock A. 1991. Quantitative-genetic basis of sprouting resistance in rye. *Plant Breed.* 106: 196–203.
- [55] Weidner S. 1992. Przedsprzędne porastanie ziarniaków zbóż i jego regulacja. *Post. Nauk Roln.* 5–6: 89–104.
- [56] Weidner S., Paprocka J., Kamieniecki B., Zadernowski R. 1993. The role of phenolic acids in dormancy of barley caryopses. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 200–211.
- [57] Weipert D. 1993. Sprouting damage and processing value of rye effects of α -amylase activity and pentosan content. In: Pre-Harvest Sprouting in Cereals, M.K. Walker-Simmons, J.L. Ried eds. American Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, USA: 448–454.
- [58] Winkler R.G., Freeling M. 1994. Physiological genetics of the dominant gibberellin-nonresponsive maize dwarfs, Dwarf 8 and Dwarf 9. *Planta* 193: 341–348.

Current trends in genetic studies on preharvest sprouting in cereals

Summary

Main achievements in revealing the complex genetic background of cereal sprouting are reviewed. In spite of the identification of some morphological, anatomical, biochemical and molecular mechanisms and genes underlying sprouting we are still far from satisfactory understanding of causes that make particular genotypes resistant to precocious initiation of metabolic processes leading to germination of grains in ears. Current knowledge allows to assume polygenic control of sprouting with the main effect of a few major genes such as: *R* alleles encoding red grain colour, gibberellin-insensitive *Rht* genes or *Vp1* gene underlying sensitivity to abscisic acid (ABA). Depending on the species and variety the resistance mechanism may represent: long dormancy, reduced contact of an embryo with water and oxygen, aleurone and embryo sensitivity to GA and ABA, high inhibitor content or decreased amylase diffusion through the endosperm cells. The main breeding perspective is to combine several mechanisms of resistance in a given variety. This can be achieved by applying different gene sources and strategies of selection, including molecular marker assisted selection and biotechnology.