

Clarté des pâtes et polymorphisme moléculaire des peroxydases - Développement de marqueurs S-SAP

Alix K., Ripetti V., David J., Roumet P., Bru D., Santoni S.

in

Royo C. (ed.), Nachit M. (ed.), Di Fonzo N. (ed.), Araus J.L. (ed.).
Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges

Zaragoza : CIHEAM

Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 40

2000

pages 475-478

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=600077>

To cite this article / Pour citer cet article

Alix K., Ripetti V., David J., Roumet P., Bru D., Santoni S. **Clarté des pâtes et polymorphisme moléculaire des peroxydases - Développement de marqueurs S-SAP.** In : Royo C. (ed.), Nachit M. (ed.), Di Fonzo N. (ed.), Araus J.L. (ed.). *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges* . Zaragoza : CIHEAM, 2000. p. 475-478 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 40)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Clarté des pâtes et polymorphisme moléculaire des peroxydases – Développement de marqueurs S-SAP

K. Alix^{*,**}, D. Bru^{**}, V. Ripetti^{*}, S. Santoni^{**}, J. David^{*} et P. Roumet^{*}

^{*}Amélioration et Ressources Génétiques du Blé Dur, Institut National de la Recherche Agronomique INRA-SGAP Mauguio, Domaine de Melgueil, F-34130 Mauguio, France

^{**}Atelier de Marquage Moléculaire, INRA, 2 place Viala, F-34060 Montpellier Cedex, France

RESUME – La clarté des pâtes de blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) est devenue aujourd'hui un objectif majeur de sélection. Diverses études présentant les peroxydases comme étant les principales enzymes responsables du brunissement des pâtes, nous avons cherché à évaluer l'implication de ces enzymes dans la variabilité de ce caractère. Nous avons ainsi développé des marqueurs moléculaires S-SAP liés aux gènes des peroxydases, pour trois populations de lignées recombinantes. Les profils obtenus ont été mis en relation avec les indices de clarté mesurés sur disques de pâte pour chaque lignée. Cette approche moléculaire nous a permis de montrer que les peroxydases étaient responsables à un niveau maximum de 10% de la variabilité du caractère "clarté des pâtes".

Mots-clés : Blé dur, clarté, brunissement, gène candidat, peroxydase, S-SAP, lignées recombinantes.

SUMMARY – "Clearness of pasta and molecular polymorphism of peroxidases – Development of S-SAP markers". The clearness of durum wheat pasta is actually an important goal in wheat breeding. Different studies suggest that peroxidases are the main enzymes responsible for the brownness of pasta, and we have therefore tried to evaluate their real implication in the variability of this character. For that purpose we have developed S-SAP markers related to peroxidase genes, for three populations of recombinant inbred lines. The S-SAP profiles obtained were correlated with the marks of clearness measured for each recombinant line. This molecular strategy allowed us to demonstrate that peroxidases were responsible for 10% of the variability of pasta clearness.

Key words: Durum wheat, clearness, brownness, candidate gene, peroxidase, S-SAP, recombinant inbred lines.

Introduction

La couleur est actuellement un critère majeur de la qualité des pâtes alimentaires et par conséquent de l'amélioration génétique du blé dur (*Triticum durum*). Si les bases biochimique et génétique de la coloration jaune sont maintenant bien définies – ce qui a permis de progresser rapidement sur ce caractère dans le domaine de la création variétale –, celles concernant le brunissement des pâtes, caractère indésirable, sont moins connues. Différentes études biochimiques réalisées dans les années 70-80 (Kobrehel *et al.*, 1972 ; Kobrehel *et al.*, 1974 ; Taha et Sagi, 1987) estiment que ce brunissement résulterait de l'oxydation de composés phénoliques sous l'action des peroxydases, au cours de la fabrication des pâtes. Un polymorphisme biochimique des peroxydases chez les variétés de blé dur a ainsi été mis en évidence. Cependant, le faible nombre de profils générés limite l'utilisation de ce polymorphisme dans la prédiction de la "note de brun" (ou à l'inverse, l'indice de clarté).

L'objectif de notre étude a donc été de développer des marqueurs moléculaires S-SAP, *Sequence-Specific Amplified Polymorphism*, (Vaughn *et al.*, 1997) liés aux gènes codant pour les peroxydases, et d'évaluer dans un dispositif génétique de lignées en ségrégation, par une approche de type 'gène candidat', l'implication de ces enzymes dans la clarté des pâtes.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal étudié est constitué de 4 variétés françaises, Néodur, Ixos, Lloyd et Primadur, présentant une variabilité importante au niveau de l'indice de clarté mesuré sur disques de pâte, et de 3 populations de lignées recombinantes (Génération F5) issues respectivement des croisements Néodur Lloyd (44 lignées), Néodur Primadur (43) et Ixos Lloyd (47).

Analyse S-SAP

La technique S-SAP, dérivée de la technique AFLP, n'utilise qu'une seule amorce PCR anonyme, la seconde étant définie spécifiquement dans une séquence nucléotidique donnée. Les ADN ont été restreints, ligués aux adaptateurs AFLP, puis préamplifiés selon le protocole classique AFLP (Vos *et al.*, 1995) en utilisant le kit *AFLP™ Analysis System I, AFLP Starter Primer Kit* (GibcoBRL®, LifeTechnologies). L'amplification sélective S-SAP a été réalisée en utilisant une amorce définie spécifiquement dans les gènes codant pour les peroxydases et marquée au $-[^{33}\text{P}]\text{ATP}$, couplée à une amorce anonyme AFLP *Mse*+3 non marquée, en suivant le protocole de Waugh *et al.* (1997).

Sur la base de la séquence du gène codant pour une peroxydase du blé, *POX1* (Hertig *et al.*, 1991), une amorce spécifique des gènes peroxydase du blé, 'blé22', a été définie dans une des régions conservées de ces gènes (Tyson, 1992 ; Omann *et al.*, 1994). Deux autres amorces, *orgeU* et *orgeL*, ont été définies dans la séquence nucléotidique du gène *Prx5* codant pour la peroxydase BP1, spécifique du grain d'orge (Rasmussen *et al.*, 1991 ; Johansson *et al.*, 1992) afin d'obtenir des amorces peroxydasiques spécifiques du grain.

Après amplification S-SAP, les échantillons ont été déposés sur un gel dénaturant à 5% de polyacrilamide. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse pendant 3 h à 70 W dans du TBE 1X. Le gel a ensuite été exposé à un film BioMax MR (Kodak) pendant 2-5 jours à -80°C . Seules les bandes intenses, et polymorphes pour au moins un croisement, ont été notées.

Analyse des données

Un test χ^2 a été réalisé sur les fréquences des bandes S-SAP notées, pour vérifier qu'elles suivaient une loi mendélienne (ratio 1:1). Les génotypages S-SAP des 3 populations étudiées ont été mis en relation avec l'indice de clarté mesuré sur disques de pâte pour chaque lignée recombinante. Les indices de corrélation R^2 ont été estimés par régression linéaire simple sur les résidus obtenus après avoir éliminé la part de variation du caractère clarté expliquée par la teneur en protéines.

Résultats et discussion

Analyse des marqueurs S-SAP

Quatre couples d'amorces ont été utilisés : *orgeL/Mse-CTA*, *orge U/Mse-CAA*, *orgeU/Mse-CTT* et *blé 22/Mse-CAA*.

Les profils obtenus sont multibandes et relativement complexes. 13 bandes intenses, lisibles sans ambiguïté, polymorphes et ségrégeant de façon mendélienne pour au moins un croisement ont été retenues (Fig.1).

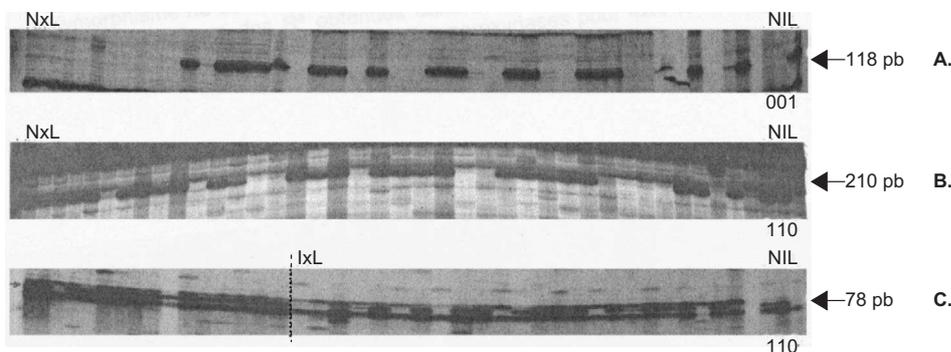


Fig.1. Exemple de ségrégation de 3 marqueurs S-SAP. Couple d'amorces utilisé : A. *orgeL/Mse-CTA*, B. *orgeU/Mse-CAA*, C. *blé22/Mse-CAA*. Les 3 derniers puits correspondent aux génotypes parentaux : Néodur (N), Ixos (I), Lloyd (L). Le nom du croisement étudié est indiqué au-dessus de la ségrégation, ex : Néodur Lloyd (N L).

Evaluation de l'implication des peroxydases dans le caractère clarté

Une régression linéaire entre les teneurs en protéines et les indices de clarté a permis de mettre en évidence l'importante implication des protéines dans le caractère clarté : elles expliquent jusqu'à 47,8 % (cas du croisement Ixos Lloyd) du caractère (Table 1). Les résidus du modèle de régression linéaire décrivant la clarté comme une fonction de la teneur en protéines ont ensuite été utilisés pour mettre en relation le polymorphisme peroxydasique et la clarté. Différents marqueurs S-SAP sont effectivement impliqués dans la clarté. Ainsi, l'absence/présence des bandes de 210 pb obtenue avec le couple orgeU/Mse-CAA et de 118 pb du couple orgeL/Mse-CTA expliquent respectivement 10,29% et 6,65% de la variation de l'indice de clarté pour le croisement Néodur Lloyd (Table 1). Le marqueur de 265 pb du couple orgeL/Mse-CTA est impliqué pour 5,81% dans les différences de clarté des lignées issues du croisement Néodur Primadur (Table 1). Aucune autre donnée majeure n'a été obtenue pour les autres marqueurs ($R^2 < 5\%$).

Table 1. Part de variation de l'indice de clarté expliquée respectivement par la teneur en protéines et l'absence/présence des marqueurs S-SAP liés aux gènes peroxydases

R ² protéines (%)	R ² peroxydases (%)													
	orgeL			orgeU						blé22				
	Mse-CTA			Mse-CAA			Mse-CTT			Mse-CAA				
	118 pb [†]	260 pb	265 pb	75 pb	108 pb	135 pb	193 pb	210 pb	400 pb	133 pb	242 pb	78 pb	197 pb	
N x L	26,93	6,65	a	b	a	a	1,33	a	10,29	a	b	0,38	1,55	a
N x P	30,54	2,71	a	5,81	a	0	b	a	4,24	a	1,14	b	b	3,31
I x L	47,8	1,05	2,76	b	b	a	0,31	2,05	3	0,09	3,24	a	2,84	b

[†]Taille du marqueur S-SAP considéré.

a : Bande monomorphe pour le croisement.

b : Bande ne suivant pas une ségrégation mendélienne pour le croisement.

Conclusions

La technique S-SAP mise en œuvre nous a permis de détecter un polymorphisme a priori directement lié aux gènes codant pour les peroxydases. Nos résultats indiquent que ce polymorphisme ne détermine qu'une faible part de la variabilité de l'indice de clarté ($R^2 = 10\%$). Par ailleurs, les valeurs des R^2 obtenues dans différents contextes génétiques laissent supposer que d'autres composés interagissent avec les peroxydases pour fixer le niveau de clarté d'un génotype. Des travaux récents supposent qu'une autre famille d'enzymes à pouvoir oxydo-réducteur interviendrait dans la coloration des produits de mouture : les polyphénol oxydases (PPO), (Kruger *et al.*, 1994 ; Park *et al.*, 1997). Une étude menée sur les PPO, similaire à celle que nous avons développée sur les peroxydases, permettra de détecter les interactions entre allèles à différents locus susceptibles d'intervenir dans la détermination de l'indice de clarté.

Références

- Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J., Mauch, F. et Dudler, R. (1991). Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant. Mol. Biol.*, 16 : 171-174.
- Johansson, A., Rasmussen, S.K., Harthill, J.E. et Welinder, K.G. (1992). cDNA, amino acid and carbohydrate sequence of barley seed-specific peroxidase BP1. *Plant. Mol. Biol.*, 18 : 1151-1161.
- Kobrehel, K., Laignelet, B. et Feillet, P. (1972). Relation entre les activités peroxydasiques et polyphénoloxydasiques des blés durs et le brunissement des pâtes alimentaires. *C.R. Acad. Agric.*, 14 : 199.
- Kobrehel, K., Laignelet, B. et Feillet, P. (1974). Study of some factors of macaroni brownness. *Cereal Chem.*, 51 : 675-684.
- Kruger, J.E., Hatcher, D.W. et DePauw, R. (1994). A whole seed assay for polyphenol oxidase in

- Canadian prairie spring wheats and its usefulness as a measure of noodle darkening. *Cereal Chem.*, 71(4) : 324-326.
- Omann, F., Beaulieu, N. et Tyson, H. (1994). cDNA sequence and tissue-specific expression of an anionic flax peroxidase. *Genome*, 37 : 137-147.
- Park, W.J., Shelton, D.R., Peterson, C.J., Martin, T.J., Kachman, S.D. et Wehling, R.L. (1997). Variation in polyphenol oxidase activity and quality characteristics among hard white wheat and hard red winter wheat samples. *Cereal Chem.*, 74(1) : 7-11.
- Rasmussen, S.K., Welinder, K.G. et Hejgaard, J. (1991). cDNA cloning, characterization and expression of an endosperm-specific barley peroxidase. *Plant Mol. Biol.*, 16 : 317-327.
- Taha, S. et Sagi, F. (1987). Relationships between chemical composition of durum wheat semolina and macaroni quality. II. Ash, carotenoid pigments and oxidative enzymes. *Cereal Res. Commun.*, 15 : 123-129.
- Tyson, H. (1992). Relationships, derived from optimum alignments, among amino acid sequences of plant peroxidases. *Can. J. Bot.*, 70 : 543-556.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. et Zabeau, M. (1995). AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23(21) : 4407-4414.
- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A.J., Pearce, S.R., Kumar, A., Thomas, B.B.T. et Powell, W. (1997). Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol. Gen. Genet.*, 253 : 687-694.