

УДК 575.2:633.16«324»

**МОРОЗОСТОЙКОСТЬ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ
И АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПО ЛОКУСАМ,
КОНТРОЛИРУЮЩИМ КАЧЕСТВЕННЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ
И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ**

*В.П. Нецветаев, А.М. Шеремет, О.В. Нецветаева
г. Белгород, г. Одесса*

Для выявления локусов и оценки влияния аллелей (или тесно сцепленных генов), контролирующих качественные биохимические признаки, на морозостойкость растений озимого ячменя исследовались гомозиготные семьи, полученные от различных комбинаций скрещивания и прошедшие отбор в процессе селекции.

Для оценки морозостойкости использовались контролируемые искусственные условия морозильных камер КНТ-1. Растения для испытания выращивали в деревянных ящиках размером 38x26x12 см, которые наполнялись смесью почвы с песком (3 : 1). Посев проводили во второй половине сентября сухими семенами (в ящике семь рядков через 5 см, в рядке 20 зерен, повторность – четырехкратная). Закалка растений проходила в естественных условиях (Одесса, ноябрь) промораживание – в декабре, в дни с минусовой температурой. Ящики с растениями размещали в камере на тележках в три яруса и устанавливали температуру, при которой они находились в естественных условиях и которую понижали со скоростью 1° в час. Промораживание проводили одновременно в разных камерах при двух режимах (табл. 1.) в течение 24 часов, после чего температуру в камере повышали до +5°С также со скоростью 1° в час, затем оттаивали ящики при +5...+8°С двое суток. В дальнейшем растения подстригали и отращивали в теплице при +15...+16°С в течение трех недель.

В соответствии с результатами электрофоретического анализа супероксиддисмутазы семьи озимого ячменя группировали по аллелям локуса Sod S [5]. Аллель Sod S1 контролирует медленно-подвижный изофермент корневой супероксиддисмутазы в стартовой зоне спектра (рис. 1).

Таблица 1

**Уровень морозостойкости озимого ячменя в зависимости
от аллельного состояния некоторых локусов (КСИ, 1993 г.)**

Символы аллелей	Промораживание при -12°С			Промораживание при -14°С		
	размер выборки	морозостойкость, %	различия, ±	размер выборки	морозостойкость, %	различия, ±
Sod S1	7	76,9±5,9		8	67,4±9,0	
Sod S2	32	79,8±3,6	-2,9	35	67,8±4,5	-0,4
Bmy 1Br	41	80,3±2,8		44	69,7±3,8	
Bmy 1Ar+	2	66,6±23,1	+13,7	3	47,9±7,4	+21,8*
Est 1Ca	33	77,7±3,4		37	66,8±4,5	
Est 1Pr	4	87,4±8,1	-9,7	4	79,0±8,5	-12,2
Est 12Be	39	81,1±2,8		43	70,3±3,7	
Est 12Hi	3	57,2±13,9	+23,9	3	43,3±20,4	+27,0

Pallidum	35	77,8±3,4		39	65,4±4,2	
Paralelum	7	87,2±2,0	-9,4*	7	86,1±2,6	-20,7***
Hrd A1	7	76,1±7,1	+13,5	7	63,4±7,1	+23,8
Hrd A2	8	62,6±8,3	-33,2***	8	39,6±10,0	-39,8*
Hrd A3	3	95,8±4,2	+6,6	4	79,4±10,3	+1,0
Hrd A14	7	89,2±6,2		7	78,4±10,3	
Hrd B3	15	86,2±3,0	+8,0	16	81,0±3,3	+19,1*
Hrd B6	9	78,2±6,8	+14,9	10	61,9±8,2	+15,0
Hrd B(др.)	8	63,3±8,0	-4,2	8	46,9±10,5	-2,4
Hrd B21	2	67,5±22,5		4	49,3±10,9	

*, **, ***- различия существенны соответственно при уровнях вероятности 0,95; 0,99; 0,999;
 $\Delta\% \text{Hrd A2} - \text{Hrd A14} = -26,6^*$ (при -12°C); $\Delta\% \text{Hrd A2} - \text{Hrd A14} = -38,6^*$ (при -14°C); $\Delta\% \text{Hrd B3} - \text{Hrd B(др.)} = +22,9^*$ (при -12°C); $\Delta\% \text{Hrd B3} - \text{Hrd B(др.)} = +34,1^{**}$ (при -14°C); $\Delta\% \text{Hrd B3} - \text{Hrd B21} = +31,7^*$ (при -14°C)

Sod S2 – более подвижный изоэнзим в этой зоне. Лocus Sod S маркирует хромосому 4 ячменя (Нецветаев, 2000). Анализ изученных семей по морозостойкости показал, что носители альтернативных аллелей локуса Sod S при обоих режимах промораживания не отличались по выживаемости после воздействия низкими температурами. В то же время следует заметить, что среди исследованных образцов преобладали формы, несущие аллель Sod S2. Встречаемость его составила $81,4 \pm 5,93\%$. Частота аллеля Sod S2 достоверно превосходит встречаемость альтернативного аллеля – Sod S1 ($t=7,48$; $P>0,999$). Следовательно, в процессе селекционной проработки мог идти отбор в пользу Sod S2.



Рис. 1. Зимোগраммы супероксиддисмутазы ячменя, выделенной из корней 5-7 дневных проростков: электрофореграммы 1 – 3, 6, 9 – 11, 15 характеризуют семьи, несущие в гомозиготе аллель Sod S1; электрофореграммы 4, 7-8, 12-14, 16 характерны для носителей аллеля Sod S1; 5 – идентифицирует гетерогенные семьи, имеющие оба аллеля Sod S1+2

Анализ амилолитических ферментов, проведенных согласно методике В.П. Нецветаева (1993), позволил выделить две группы семей, отличающихся аллелями локуса *Vmy 1*, контролирующих синтез бета-амилаз. Символика обозначения аллелей и контролируемых ими изоферментов описана ранее [11, 14]. Варианты этих ферментов, выявляемые при разделении в полиакриламидном геле, представлены на рис. 2.

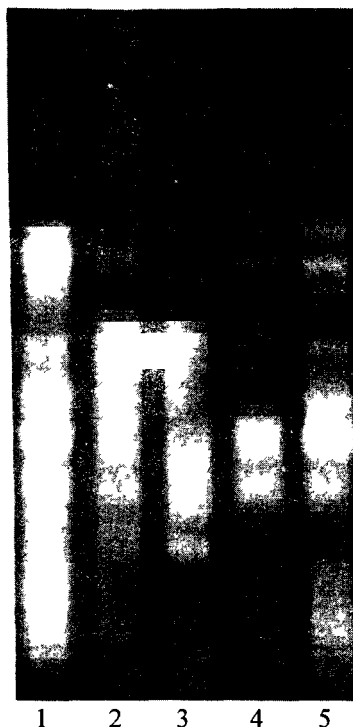


Рис. 2. Зимограммы бета-амилазы ячменя, выделенной из зрелого сухого зерна:
1 – Psaknon (Вmy 1Br), 2 – Algerian (Вmy 1Al), 3 – Magnum (Вmy 1Ar), 4 – Hor. 1402 (Вmy 1Al),
5 – C.I. 3725 (Вmy 1Br)

Изучение растительного материала позволило выделить единичные семьи, несущие фактор Вmy 1Ar, характерный для ярового сорта Agamir. Остальные образцы являлись носителями аллеля Вmy 1Br (яровой сорт Birka). Аллель Вmy 1Al, описанный в яровой культуре [11, 13], среди исследованного материала не обнаружен. Лocus Вmy 1 картирован в длинном плече хромосомы 4 [11, 13, 14].

Приведенные данные (табл. 1.) свидетельствуют, что аллель Вmy 1Br статистически сопряжен с повышенной морозостойкостью по сравнению с аллелем Вmy 1Ar. Характерно, что locus Вmy 1 расположен вблизи гена sh2, контролирующего тип развития ячменя [10]. Следует заметить, что среди исследованных образцов преобладали формы, несущие аллель Вmy 1Br. Очевидно, что в этом случае, как и при анализе супероксиддисмутазы, шла селекция в пользу одного аллеля – Вmy 1Br. Так, частота фактора Вmy 1Br составила $0,936 \pm 0,036$, а – Вmy 1Ar равнялась $0,064 \pm 0,036$. Следовательно, данные аллели существенно различались по встречаемости в исследуемом материале перспективных образцов озимого ячменя ($t=17,13$; $P>0,999$).

Исследование эстераз в соответствии с прописью В.П. Нецветаева показало, что представленный материал был мономорфным по локусам Est 2, Est 5, Est 11, но был гетерогенен по локусам Est 1 и Est 12. Зимотипы эстераз, контролируемых указанными локусами, для наших условий электрофоретического разделения фермента описаны ранее [11, 12], и представлены на рис. 3. Лocus Est 1 расположен в длинном плече хромосомы 3, а locus Est 12 находится в хромосоме 2 ячменя [12, 13]. По локусу Est 1 было идентифицировано 2 аллеля: Est 1Ca и Est 1Pr. Аллель Est 1Ca контролирует более подвижный изофермент в зоне эстеразы 1 (рис. 3, зимограммы 1-6, 11, 13-17), а аллель Est 1Pr обуславливает синтез менее подвижного фермента в этой части электрофореграммы (рис. 3., зимограммы 8-10). На зимограмме 12 (рис. 3.) присутствуют оба изофермента: эстераза 1Pr и эстераза 1Ca. Среди изученных образцов преобладал фактор Est 1Ca (табл. 1). Встречаемость этого аллеля составляла $90,2 \pm 4,6\%$, а фактора Est 1Pr – $9,8 \pm 4,6\%$. Следовательно, по частотам встречаемости среди селекционного материала

эти аллели показали существенные различия ($t=12,27$; $P>0,999$). Судя по результатам обоих режимов проморозки, наблюдалась тенденция в пользу лучшей выживаемости семей, несущих аллель Est 1Pr (табл. 1). Следует отметить, что эта тенденция оказалась статистически недоказуемой. В то же время отбор шел в пользу альтернативного аллеля – Est 1Ca. Очевидно, в данном случае направление отбора не совпадало с оценкой сопряженности данных аллелей по морозостойкости. Характерно, что у ярового ячменя распространение аллеля Est 1Ca, в противоположность к встречаемости Est 1Pr, отрицательно коррелировало с континентальностью климата и температурой зон возделывания, но положительно – с влагообеспеченностью [4].

Анализ эстеразы 12 позволил идентифицировать два аллеля: Est 12Be и Est 12Hi. Зимотипы эстераз 12, контролируемые этими аллелями, представлены на рис. 3. Аллель Est 12Be контролирует наименее подвижный изофермент в верхней части зимограммы, а Est 12Hi отвечает за синтез более подвижного изоэнзима в этой части электрофоретического спектра (рис. 3, зимограммы 3 и 4). Оценка уровня морозостойкости семей озимого ячменя, несущих альтернативные аллели локуса Est 12, показала, что они несущественно отличались между собой по этому показателю. В то же время при обоих режимах проморозки наблюдалась тенденция в пользу лучшей выживаемости форм, несущих более распространенный аллель среди исследуемого материала – Est 12Be. Характерно, что фактор Est 12Hi встретился только у трех семей. Ошибка средней арифметической по морозостойкости семей нивелировала наблюдаемые различия между выделенными выборками. По частотам встречаемости аллелей Est 12Be ($0,935\pm 0,036$) и Est 12Hi ($0,065\pm 0,036$) различия достоверны ($t=17,09$; $P>0,999$). Следовательно, направление отбора в данном случае совпадало с оценкой сопряженности данных факторов по морозостойкости.

Наследственный фактор, контролирующий плотноколосость (разновидность *Parallelum*), оказался статистически связанным с формированием более высокой морозостойкости в отличие от гена, обуславливающего альтернативное проявление признака – рыхлоколосости (разновидность *Pallidum*). Признак плотноколосости, распространенный в культуре ячменя, контролируется рецессивным геном *l*, расположенным в хромосоме 1 (Søgaard and von.Wettstein-Knowles, 1987) в длинном плече [16]. Рыхлый колос, чаще встречающийся у озимого ячменя, обусловлен доминантным геном *L*. Среди перспективного селекционного материала частота доминантного аллеля *L* ($0,848\pm 0,053$) оказалась значительно больше встречаемости фактора *l* ($0,152\pm 0,053$). Различия в частотах существенны ($t=9,29$; $P>0,999$). В данном случае направление отбора не совпадает со значимостью аллелей как маркеров морозостойкости. Учитывая, что плотноколосые формы являются мелкозерными, по такому элементу продуктивности, как масса зерновки, они уступают рыхлоколосым образцам ячменя. Вероятно, это определило направление отбора в пользу аллеля *L*.

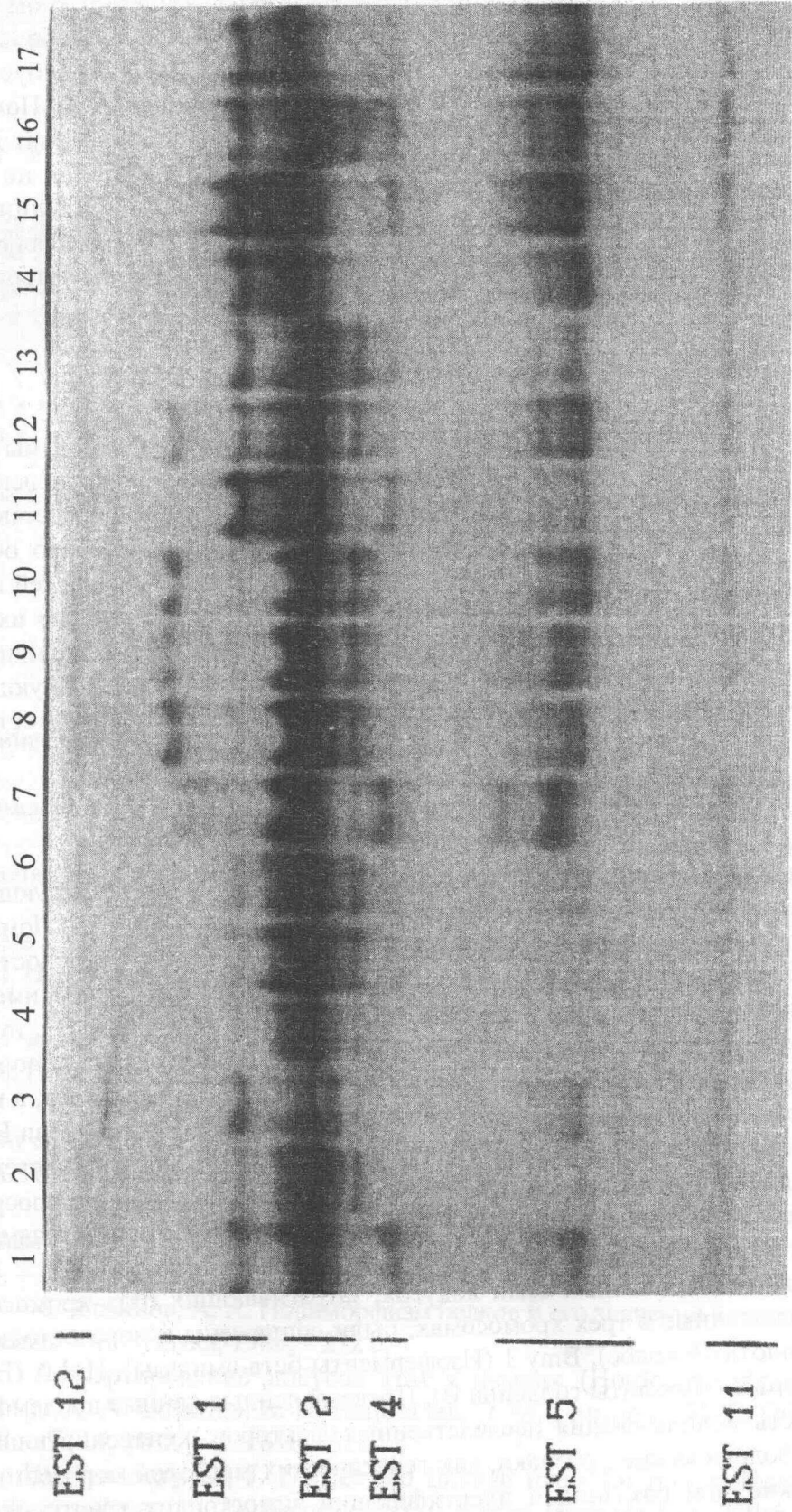


Рис. 3. Зимограммы листовых эстераз ячменя: 1 – КМ 1448-1948, 2 – Первенец, 3 – Nigrate (С.І. 2444), 4 – Ricardo (С.І. 6306), 5 – Duplex (С.І. 2433), 6 – Heils Hanna (С.І. 682), 7 – Almoга (H2780), 8 – Отра, 9 – Линия 1370, 10 – Зазерский 85, 11 – Север 1, 12 – Приморский 89, 13 – Омский 11464 (к-18033), 14 – Омский 10664 (к-16634), 15 – Омский 13709, 16 – Омский 80, 17 – Новоомский

Спирторастворимые запасные белки эндосперма ячменя (гордеины) контролируются двумя основными локусами: Hrd A и Hrd B [9]. Они гомеологичны локусам Gld 1 и Gld 6 пшеницы, находящимся под генетическим контролем 1 и 6 хромосом геномов A, B и D [8]. Анализ исследуемого материала показал, что с наибольшей частотой встречались аллели Hrd A2, Hrd A1, Hrd A14 и Hrd A3 (табл. 1), обуславливающие синтез соответствующих вариантов гордеинов, описанных А.А. Поморцевым и др. (1985). Результаты проморозки при двух режимах не противоречат друг другу. В обоих случаях носители аллеля Hrd A3 существенно превосходили по морозостойкости семьи, содержащие аллель Hrd A2 (табл. 1), и имели тенденцию в превосходстве над остальными гордеинкодирующими факторами. В целом аллели, контролирующие варианты гордеина А, можно расположить в следующем порядке по сопряженности их с морозостойкостью:

$$\text{Hrd A3} = \text{Hrd A14} \geq \text{Hrd A1} \geq \text{Hrd A2}$$

В соответствии с аллельным состоянием по локусу Hrd B исследуемые формы были объединены в 4 группы, представленные в табл. 1. Как видно, самая многочисленная группа имела аллель Hrd B3. Вариант гордеина, контролируемый Hrd B3, представлен на рис. 4. Здесь же можно найти типы электрофореграмм белков, синтез которых обеспечивается факторами Hrd B6 и Hrd B21. Анализ носителей тех или иных аллелей гордеинкодирующего локуса Hrd B по морозостойкости показал дифференциацию их по этому свойству. Так, семьи, имевшие аллель Hrd B3, существенно превосходили по выживаемости формы с другими аллелями по локусу Hrd B. Аллели, контролирующие варианты гордеина B, можно расположить в следующем порядке по сопряженности с морозостойкостью:

$$\text{Hrd B3} > \text{Hrd B6} \geq \text{Hrd B21} = \text{Hrd B(др.)}$$

В целом, полученные результаты свидетельствуют о связи гордеинкодирующих факторов с уровнем морозостойкости ячменя, что согласуется с выводами А.А. Поморцева (1982). Это же касается ранжирования аллелей локуса Hrd B по сопряженности с зимостойкостью. В то же время ученым показано, что носители фактора Hrd B6 имели большую морозостойкость по сравнению с сортами, несущими как аллель Hrd B3, так и другие аллели. Это несоответствие можно объяснить тем, что в нашем случае донором фактора Hrd B3 явился не *Hordeum vulgare*, с которым имел дело А.А. Поморцев, а новый источник – *Hordeum spontaneum*. В частности, от этого источника несет аллели Hrd B3 такой сорт озимого ячменя, как Одесский 165. Эти несовпадения могут свидетельствовать о том, что связь вариантов гордеина с морозостойкостью скорее всего опосредована за счет эффекта сцепления гордеинкодирующих локусов с фактором (генами), обуславливающим устойчивость растения к низким температурам.

Таким образом, из исследованных семи локусов, затрагивающих пять хромосом ячменя, четыре, расположенные в трех хромосомах, были сопряжены с морозостойкостью: L1 (Рыхлый vs. плотный колос), Bmy 1 (Изоферменты бета-амилазы), Hrd A (Варианты гордеина А), Hrd B (Варианты гордеина В). Представленные данные продемонстрировали возможность использования наследственных факторов, контролирующих биохимические и морфологические признаки, как генетических маркеров морозостойкости, что крайне важно при создании и идентификации зимостойких генотипов в культуре озимого ячменя.

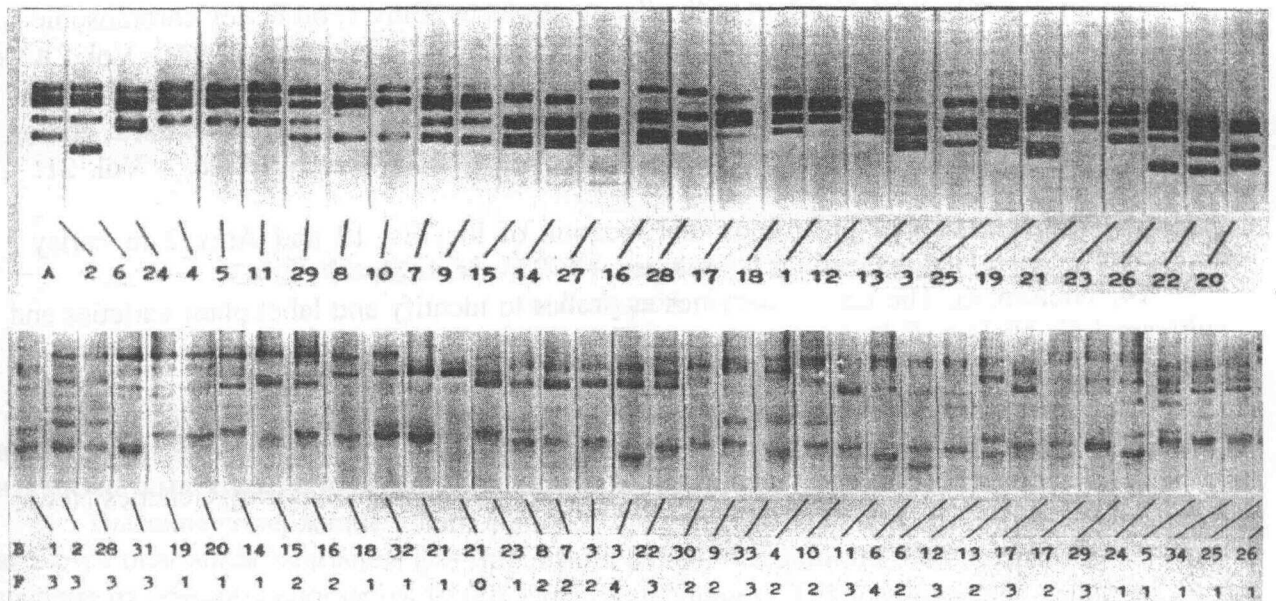


Рис. 4. Некоторые блоки компонентов гордеина А, В и F, контролируемые локусами Hrd A, Hrd B и Hrd F. Цифры обозначают присвоенный номер вариантов гордеинов HRD A, B и F, контролируемых соответствующими аллелями локусов Hrd A, Hrd B и Hrd F. (Разделение в алюминийлактатной системе крахмального геля, рН 3,1)

ЛИТЕРАТУРА

1. Нецветаев, В. П. Идентификация листовых эстераз 11 и 12 у ячменя и их генетический контроль / В. П. Нецветаев // Генетика. – 1992. – Т. 28, № 3. – С. 105-119.
2. Нецветаев, В. П. Использование двойных дителосомиков для локализации генов у ячменя / В. П. Нецветаев // Цитология и генетика. – 1992а. – Т. 26, № 1. – С. 26-30.
3. Нецветаев, В. П. Расположение В-амилазного локуса (Wmu 1) в хромосоме 4 ячменя / В. П. Нецветаев // Цитология и генетика. – 1993. – Т. 27, № 5. – С. 74-78.
4. Нецветаев, В. П. Теоретические основы использования белкового полиморфизма для оптимизации селекционного процесса : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / В. П. Нецветаев. – СПб. : ВИР. – 2000. – 49 с.
5. Нецветаев, В. П. Распределение аллелей супероксиддисмутазного локуса, Sod S, в культуре ярового ячменя по территории бывшего СССР / В. П. Нецветаев, А. А. Поморцев, И. С. Крестинков // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 12. – С. 1664-1670.
6. Поморцев, А. А. Генетически обусловленный полиморфизм гордеина и возможности его использования в селекции озимого ячменя : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. А. Поморцев. – Немчиновка, 1982. – 6 с.
7. Поморцев, А. А. Полиморфизм культурного ячменя (*Hordeum vulgare*) по гордеинам / А. А. Поморцев, В. П. Нецветаев, А. А. Созинов // Генетика. – 1985. – Т. 21, № 4. – С. 629-639.
8. Созинов, А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции / А. А. Созинов. – М. : Наука, 1985. – 272 с.
9. Картирование локусов Hrd у ячменя (*Hordeum vulgare* L. emend. Vav. et Bacht.) / А. А. Созинов, В. П. Нецветаев, Э. М. Григорян, И. С. Образцов // Генетика. – 1978. – Т. 14, № 9. – С. 1610-1619.
10. Franckowiak, J. D. Revised linkage maps for morphological markers in barley, *Hordeum vulgare* / J. D. Franckowiak // Barley Genetics Newsletter. – 1997. – Vol. 26. – P. 9-18.

11. Netsvetaev, V. P. Position of the β -amylase locus, Bmy 1, on barley chromosome 4 in relation to four genes / V. P. Netsvetaev // Barley Genetics Newsletter. – 1992. – Vol. 21. – P. 67-69.
12. Netsvetaev, V. P. Location on barley chromosome 3 of loci Est 1 and Est 2, coding esterases 1 and 2 / V. P. Netsvetaev // Barley Genetics Newsletter. – 1992a. – Vol. 21. – P. 63-66.
13. Netsvetaev, V. P. Chromosomal location of loci Est 12 and Amy 2 in barley / V. P. Netsvetaev // Barley Genetics Newsletter. – 1993. – Vol. 22. – P. 42-43.
14. Nielsen, G. The use of isozymes as probes to identify and label plant varieties and cultivars / G. Nielsen // Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research. – 1985. – Vol. 12. – P. 1-32.
15. Søgaard, B. Barley: Genes and chromosomes / B. Søgaard, P. von Wettstein-Knowles // Carlsberg Research Communications – 1987. – Vol. 52, № 2. – P. 123-196.
16. Tsuchiya, T. Linkage maps of barley, 1982 / T. Tsuchiya // Barley Genetics Newsletter – 1982. – Vol. 12. – P. 100-104.