



УДК 633.11.«324»:575.174.015.3

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВАРИАНТОВ АЛЬФА-АМИЛАЗ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И СОПРЯЖЕННОСТЬ ЗИМОТИПОВ ФЕРМЕНТА С КОЛИЧЕСТВЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ РАСТЕНИЙ

## POLYMORPHISM OF ALFA-AMYLASE AND CONJUGATION IN COMMON WHEAT ENZYME TYPES WITH QUANTITATIVE TRAITS OF PLANTS

**В.П. Нецветаев<sup>1</sup>, Л.С. Бондаренко<sup>1, 2</sup>, И.П. Моторина<sup>1</sup>**

**V.P. Netsvetaev<sup>1</sup>, L.S. Bondarenko<sup>1, 2</sup>, I.P. Motorina<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Белгородский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Россия, 308001, г. Белгород, ул. Октябрьская, 58

<sup>2</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

<sup>1</sup> Belgorod State Research Institute of Agriculture RAA, 58 Oktjabr'skaja St, Belgorod, 308001, Russia

<sup>2</sup> Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St, Belgorod, 308015, Russia

E-mail: v.netsvetaev@yandex.ru; netsvetaev@bsu.edu.ru

*Ключевые слова:* α-амилаза, озимая мягкая пшеница, наследование, зимотипы, количественные признаки.

*Key words:* α-amylase, winter common wheat, inheritance, enzyme types, quantitative traits.

*Аннотация.* Используя полиморфизм альфа-амилазы в культуре озимой мягкой пшеницы изучили наследование изоэнзимов этого фермента и сопряженность его зимотипов с прорастаемостью зерна на корню, зерновой продуктивностью, высотой растений и временем колошения.

Показано, что полиморфизм изоферментного состава альфа-амилазы мягкой пшеницы ограничивается присутствием разных локусов, продукты которых близки по электрофоретическим параметрам. В связи с этим, один компонент энзима может контролироваться как одним, так и двумя или тремя генами.

Идентифицирован локус, контролирующий изоэнзим альфа-амилазы в быстро подвижной части электрофореграммы, обозначенный как α-Аму-В7. Он расположен в хромосоме 6BL на расстоянии 0.95±0.39% рекомбинации от фактора α-Аму-В6.

С целью создания новых сортов озимой мягкой пшеницы, обладающих большей устойчивостью к прорастанию зерна в колосе целесообразно вести отбор генотипов с сочетанием вариантов альфа-амилазы: АСУХ. В целом, присутствие гена В1 (Безостость) и кодоминантных аллелей локусов α-Аму-В6 и α-Аму-В7, расположенных в хромосомах 5А и 6BL, обуславливает снижение степени прорастания зерна в колосе. Использование данных генетических маркеров может быть эффективно в связи с тем, что погодные условия вегетационного периода не всегда способствуют проявлению этого количественного признака.

*Resume.* Using polymorphism of alpha-amylase in the winter common wheat we studied inheritance isoenzymes and its conjugation enzyme types with germinating grain on the "vine", grain productivity, plant height and time of ear formation.

It is shown that the polymorphism isoenzyme of alpha-amylase wheat is limited by the presence of different loci whose products are similar in electrophoretic parameters. In this regard, one component of the enzyme can be controlling at one or two or three genes.

Identification of a locus controlling alpha-amylase isoenzyme in the fast moving part of the electrophoretogram, designated as α-Amy-B7. It is located on chromosome 6BL at a distance 0.95+0.39% of the recombination to factor α-Amy-B6.

In order to create new varieties of winter common wheat, with greater resistance to grain germination in the ear it is appropriate to maintain the selection of genotypes with a combination of alpha-amylase variants: АСУХ. In general, the presence of the gene B1 (awnless) and codominant alleles of loci α-Amy-B6 and α-Amy-B7, located on chromosomes 5A and 6BL, causes a reduction in the degree of seed germination in the ear. Using these genetic markers can be effective due to the fact that the weather conditions of the vegetation period do not always promote display of this quantitative trait.

### Введение

У мягкой пшеницы альфа-амилазы контролируются локусами, расположенными в длинных плечах 6-й гомеологичной группы хромосом, а также хромосомами 7-й гомеологичной группы [Nishikawa, Nobuhara, 1971; Gale et al., 1983; Ainsworth et al., 1985; Илличевский и др., 1989; Рыбалка и др., 1989; Nishikawa, 1991; Nishikawa et al., 1993; Mrva, Mares, 1999; Нецветаев и др., 2012]. Локусы, расположенные в хромосомах 6 геномов А, В, D получили символы, соответственно, α-Аму А1, α-Аму В1, α-Аму D1, а локусы хромосом 7 – α-Аму А2, α-Аму В2, α-



Amy D2 [Gale et al., 1983]. Более детальный генетический анализ показал, что хромосома 6В оказалась наиболее насыщена генетическими факторами, контролирующими синтез этого фермента [Nishikawa et. al., 1993; Нецветаев и др., 2012]. В длинном плече этой хромосомы кроме фактора,  $\alpha$ -Amy B1, были идентифицированы локусы:  $\alpha$ -Amy-B3,  $\alpha$ -Amy-B4,  $\alpha$ -Amy-B5 и  $\alpha$ -Amy-B6. Информация об ассоциации наследственных вариантов ферментов альфа-амилазы с количественными признаками и свойствами растений мягкой пшеницы в литературе отсутствует.

Целью исследования было изучить наследование полиморфных вариантов  $\alpha$ -амилазы прорастающего зерна мягкой пшеницы и оценить сопряженность зимотипов этого фермента с количественными признаками растений этой культуры.

### Материал и методы

Для генетического анализа использовали самоопыляющиеся популяции озимой мягкой пшеницы старших поколений ( $F_{\infty}$ ), отобранных из конкурсного и предварительного испытания ГНУ Белгородского НИИСХ Россельхозакадемии урожая 2013 г. Анализировали отдельные зерна по составу  $\alpha$ -амилазы методом электрофореза их экстрактов. Для идентификации гетерогенности образцов по альфа-амилазе использовалось не менее 3-х отдельных проросших зерен. Сопряженность зимотипов амилазы с количественными признаками устанавливалась на основе исследования конкурсного испытания урожая 2012 и 2013 годов.

Зерно предварительно обеззараживали раствором  $KMnO_4$  нагретым до  $75^{\circ}C$  в течение 30 сек., промывали дистиллированной водой и проращивали в темноте при комнатной температуре в течение 4 суток.

Для экстракции фермента проросшая зерновка заливалась 0.2% раствором двууглекислой соды ( $NaHCO_3$ ), содержащим 20% сахарозы и 0.03% бромфенолового синего. Количество экстрагирующего раствора 250 мкл на зерновку. После тщательного измельчения каждой зерновки в отдельных пластмассовых пробирках палочкой из нержавеющей стали, проводили центрифугирование в течение 4 мин. при 10000 об./мин. Затем, осуществляли прогрев закрытых пробирок с супернатантом при  $80^{\circ}C$  в течение 20–25 мин. Подготовленная таким образом надосадочная жидкость наносилась в стартовые ячейки по 2–3 мкл.

Электрофорез выполняли в пластинах 7.5% полиакриламидного геля размером  $190 \times 105 \times 1$  мм на приборах, изготовленных в Селекционно-генетическом институте УААН (Одесса) [Нецветаев и др., 2012]. Условия электрофореза описаны ранее [Рыбалка и др., 1989; Нецветаев и др., 2012]. Электрофоретическое разделение велось в трис-глициновом буфере pH 8.4 при напряжении в 300 В. Прекращали разделение изоферментов после выхода 2.5 меток бромфенолового синего (длительность около 2.5 час.).

Инкубацию амилаз проводили в 1% растворе гидролизованного крахмала в 0.1M ацетатном буфере, pH 5.4, который перед этим при помешивании доводился до кипения [Нецветаев и др., 2012]. Время инкубации 30 мин. при комнатной температуре. После окончания инкубации гелевые пластины промывали проточной водой и окрашивали раствором йода в йодистом калии (0.5 г  $KI$ , 260 мг  $I_2$ , 6 г трихлоруксусной кислоты, вода до 100 мл).

Для оценки сцепления использовали подход изложенный ранее [Netsvetaev, Sozinov, 1984; Нецветаев, 2008].

### Экспериментальная часть и обсуждение

Для генетического анализа были отобраны гетерогенные образцы зерна озимой мягкой пшеницы из конкурсного и предварительного испытания ГНУ Белгородского НИИСХ Россельхозакадемии, представляющие самоопыляющиеся популяции  $F_{\infty}$ . Так, на рисунке 1 представлены варианты альфа-амилазы встречающиеся в  $F_{\infty}$  66/09 X Богданка.

Анализ 192 зерен этой гомозиготной популяции по этому ферменту показал, что по верхней части зимограмм встречалось только три фенотипических класса: 1 – наличие двух зон активности; 2 – активность только в медленно-подвижной части; 3 – активность только в более подвижной части электрофореграммы (рис. 1). Оценка расщепления по каждой зоне активности, включая нижнюю часть спектра зимограмм, представлена в таблице 1.

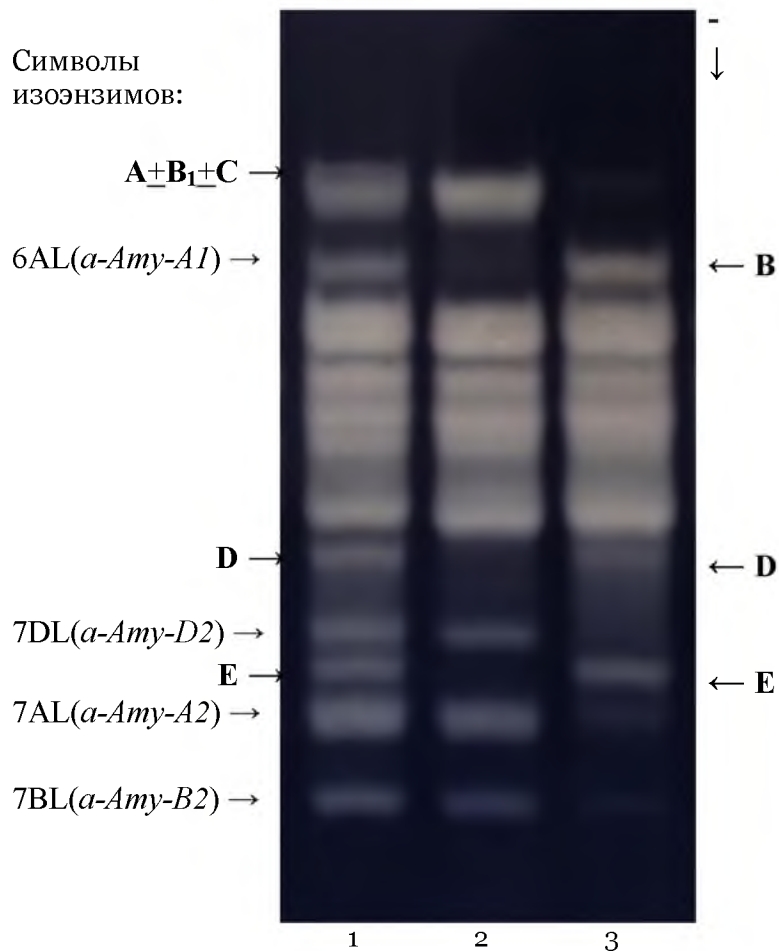


Рис. 1. Расщепление по альфа-амилазе отдельных зерен в популяции  $F_{\infty}$  202/13 = (66/09 X Богданка) озимой пшеницы (КСИ-13, БелНИИСХ). Жирным шрифтом обозначены изоэнзимы, по которым наблюдалось расщепление

Fig. 1. Inheritance by alpha-amylase individual grains in the population  $F_{\infty}$  202/13 = (66/09 X Bogdanka) of winter wheat (Comp.Test-13, BelNIISKH). Bold marked isoenzymes, for which was observed segregation

Таблица 1  
Table 1

**Наследование изоэнзимов альфа-амилазы в  $F_{\infty}$  66/09 X Богданка**  
**Inheritance isoenzymes alpha-amylase in the  $F_{\infty}$  66/09 X Bogdanka**

Обозначение зимотипа	Обозначение фенотипов		Ожидаемое соотношение	$\chi^2$	P
	XX	xx			
A	162	30	1 : 1	90.75	<0.01
			3 : 1	9.00	<0.01
			7 : 1	1.71	>0.10
			15 : 1	28.80	<0.01
B	106	86	1 : 1	2.08	>0.10
			3 : 1	40.11	<0.01
D	99	93	1 : 1	0.19	>0.50
E	97	95	1 : 1	0.02	=0.90

Судя по наследованию, наименее подвижный компонент А альфа-амилазы контролируется тремя локусами ( $\chi^2_{7:1} = 1.71$ ;  $P > 0.10$ ). Следовательно, этот компонент может быть сложным и включать дополнительные изоэнзимы, обозначенные  $B_1$  и  $C$  (см. рис. 1). Компонент В показал моногенный тип наследования ( $\chi^2_{3:1} = 2.08$ ;  $P > 0.10$ ). Ранее установлено, что этот изоэнзим контролируется локусом, расположенным в хромосоме 6AL [Илличевский и др., 1989;



Рыбалка и др., 1989] и обозначенным  $\alpha$ -Аму-А1 [Ainsworth et al., 1985]. Изофермент D наследовался по моногенному типу ( $\chi^2_{1:1} = 0.19; P > 0.50$ ). Ген, контролирующий его, имеет символ  $\alpha$ -Аму-В6 и расположен в хромосоме 6ВL между локусами  $\alpha$ -Аму-В3 и  $\alpha$ -Аму-В1 [Нецветов, 2012]. Более подвижный изоэнзим Е показал моногенный характер наследования ( $\chi^2_{1:1} = 0.02; P = 0.90$ ). Локализация гена, контролирующего его синтез, не была известна.

В медленно подвижной части спектра альфа-амилаз выявлено лишь три фенотипических класса: **A** (=A+B<sub>1</sub>+C) : **A+B** : **B** (см. рис. 1), имевшие, соответственно, следующие численности 106 : 56 : 30. Интерпретировать такое расщепление в F<sub>∞</sub> позволяет схема ожидаемых численностей при трехфакторном наследовании (рис. 2).

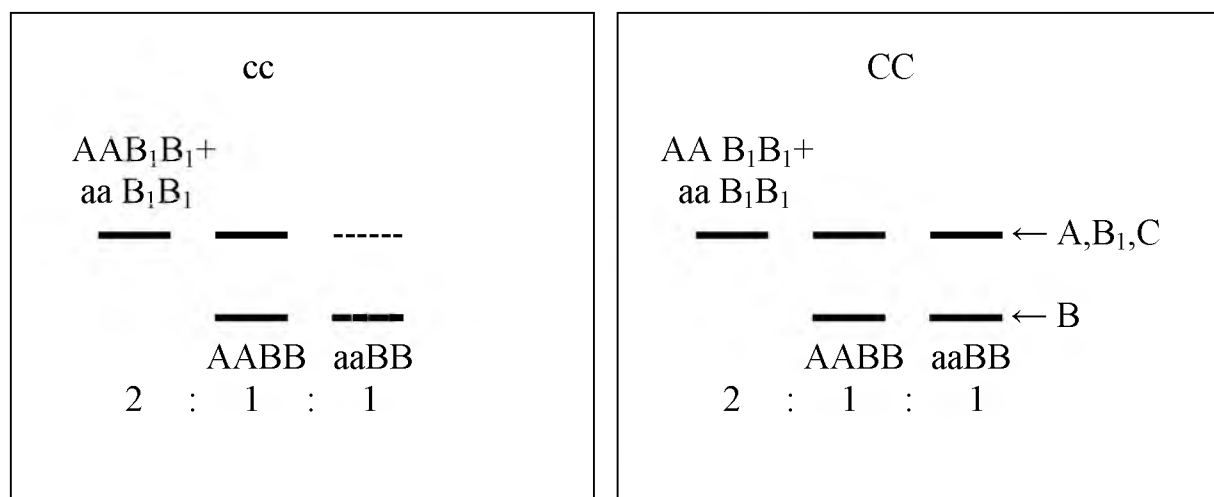


Рис. 2. Схема наблюдаемых фенотипических классов в F<sub>∞</sub> 66/09 X Богданка по изоферментам альфа-амилазы медленноподвижной зоны электрофореграмм и ожидаемые численные соотношения между ними

Fig. 2. Scheme of the observed phenotypic classes in F<sub>∞</sub> 66/09 X Bogdanka by alpha-amylase isozymes in slow mobility area zymogram and the expected numerical ratio between them

Следовательно, в соответствии с этой схемой соотношение фенотипов A : A+B : B будет 4 : 3 : 1. Оценка сцепления изученных факторов дала величину  $\chi^2_L = 2.31 (P > 0.10)$ , что свидетельствует о независимом наследовании этих факторов. Полученное расщепление свидетельствует также о том, что «аллельный» вариант B<sub>1</sub> изоэнзима В имеет подвижность идентичную компоненту А. Изоэнзим А обусловлен локусом  $\alpha$ -Аму-Д1, а изоэнзим В, контролирует фактор  $\alpha$ -Аму-А1, описанные ранее [Илличевский и др., 1989; Рыбалка и др., 1989]. Очевидно, что изоэнзим С с электрофоретической подвижностью идентичной изоэнзиму А, обусловлен активностью третьего локуса  $\alpha$ -Аму-В1. Следовательно, судя по расщеплению, в рассмотренной комбинации скрещивания задействованы также другие аллели известных локусов, контролирующих изоферментный состав альфа-амилазы мягкой пшеницы.

На основе анализа F<sub>∞</sub> 66/09 X Богданка проведена оценка сцепления генов, контролирующих синтез компонентов D и E альфа-амилазы пшеницы. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2  
Table 2

**Оценка сцепления локусов, контролирующих изоферментный состав альфа-амилазы в комбинациях F<sub>∞</sub> 66/09 X Богданка (I) и F<sub>∞</sub> Харус X 650/00 (II)**  
**Evaluation coupling loci controlling composition isozyme alpha-amylase in combinations F<sub>∞</sub> 66/09 Bogdanka X (I) and F<sub>∞</sub> Kharus X 650/00 (II)**

Комбинация	Обозначение изоэнзимов	Символы локусов	Фенотипические классы			n	$\chi^2_L$	Рекомбинация, %
			XX	xx				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	B - D	$\alpha$ -Аму-А1 X $\alpha$ -Аму-В6	YY	40	46	192	1.69	независимая
			yy	59	47			
I	B - E	$\alpha$ -Аму-А1 X $\alpha$ -Аму-В7	YY	41	45	192	3.75	независимая
			yy	56	50			



Окончание таблицы 2  
End of table 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	D - E	$\alpha$ -Amy-B6 X	YY	96	1	192	176.33	1.06±0.54
		$\alpha$ -Amy-B7	yy	3	92			
II	D - E	$\alpha$ -Amy-B6 X	YY	70	2	129	121.13	0.79±0.56
		$\alpha$ -Amy-B7	yy	0	57			
I+II	D - E	$\alpha$ -Amy-B6 X	YY	166	3	321	297.45	0.95±0.39
		$\alpha$ -Amy-B7	yy	3	149			

Как видно, изофермент В, контролируемый локусом  $\alpha$ -Amy-A1, независимо наследовался с компонентами D и E. В то же время, изоэнзимы D и E показали сцепленное наследование. Изоэнзим D контролируется локусом  $\alpha$ -Amy-B6 идентифицированным ранее и локализованным вблизи гена  $\alpha$ -Amy-B1 на хромосоме 6B [Нецветаев, 2012]. Сопоставляя данные по оценкам сцепления локусов, контролирующими изоферментный состав альфа-амилазы пшеницы в хромосоме 6BL [Нецветаев, 2012; Nishikawa et al., 1993] можно сделать вывод, что за синтез компонента E ответственен новый локус обозначенный как  $\alpha$ -Amy-B7. Следовательно, он наиболее тесно сцеплен с фактором  $\alpha$ -Amy-B6. Положение его относительно других, контролирующих изоферментный состав альфа-амилазы пшеницы, на генетической карте хромосомы 6BL остается открытым.

Комбинация скрещивания  $F_{\infty}$  Харус X 650/00 была гетерогенна только по изоферментному составу альфа-амилазы быстроподвижной зоны электрофореграмм. Некоторые типы зимограмм этой популяции представлены на рисунке 3.

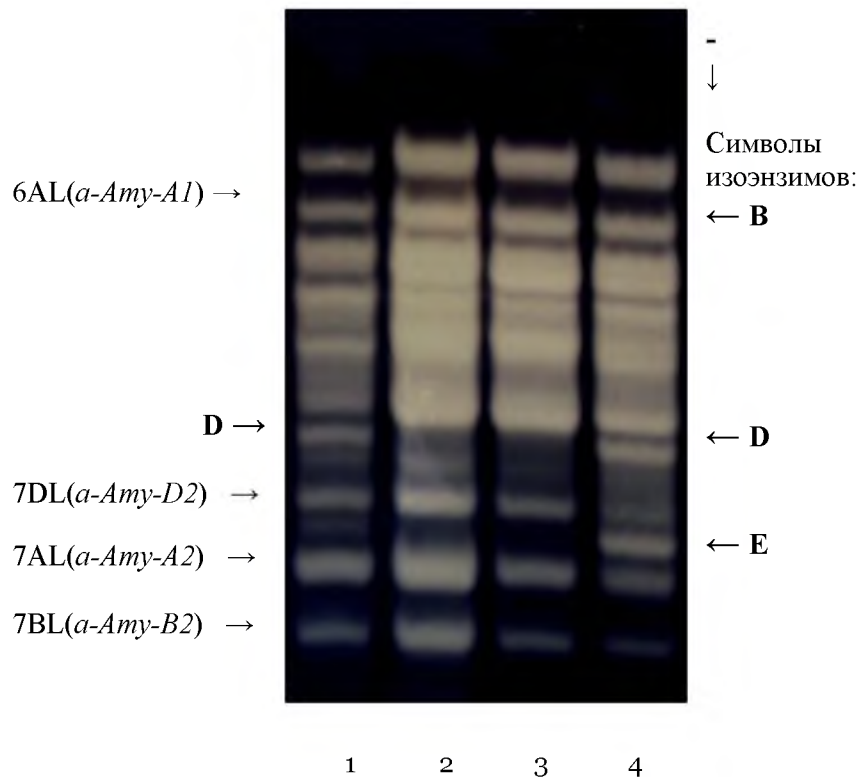
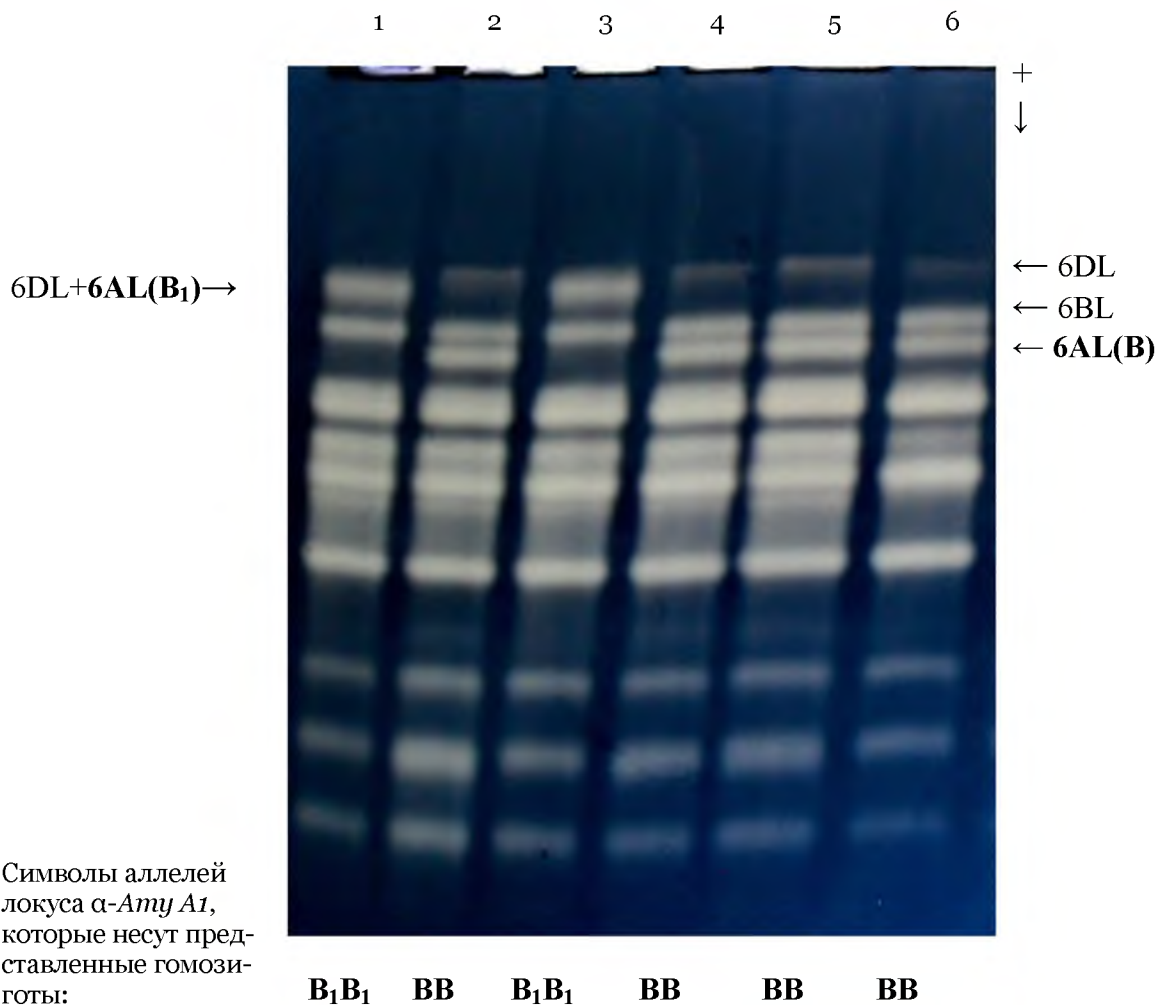


Рис. 3. Некоторые сочетания изоэнзимов альфа-амилазы пшеницы в  $F_{\infty}$  Харус X 650/00: 1 – рекомбинантный фенотип (DDee), 2–3 – фенотип  $P_1$  (ddee), 4 – фенотип  $P_2$  (DDEE)  
Fig. 3. Some combination of alpha-amylase isoenzymes in wheat  $F_{\infty}$  Kharus X 650/00: 1 – recombinant phenotype (DDee), 2–3 –  $P_1$  phenotype (ddee), 4 – phenotype  $P_2$  (DDEE)

В данном случае, как и в предыдущем, обнаружены рекомбинантные типы зимограмм, количество которых отражено в таблице 2. Анализ наследования изоэнзимов D и E подтвердил моногенный тип наследования каждого из них. Так,  $\chi^2_{1:1}$  для компонента D составил 1.74 ( $P > 0.10$ ), а для изоэнзима E был равен 0.94 ( $P > 0.25$ ), что в обоих случаях свидетельствует о монофакторном наследовании. Оценка сцепления генов, контролирующих эти компоненты, при-

ведена в таблице 2. Она составила  $0.79 \pm 0.56\%$  рекомбинации, что близко к величинам, полученным на предшествующей популяции. Усредненная оценка сцепления по двум комбинациям скрещивания  $F_{\infty}$  66/09 X Богданка и  $F_{\infty}$  Харус X 650/00 между локусами  $\alpha$ -Amy-B6 и  $\alpha$ -Amy-B7 составила  $0.95 \pm 0.39\%$  (см. табл. 2).

Наследование компонентов альфа-амилазы медленно подвижной зоны зимограмм исследовалось также на других популяциях  $F_{\infty}$ . Так, на рисунке 4 представлены изоэнзимы этого фермента, наблюдаемые в гетерогенной гомозиготной популяции  $F_{\infty}$  33/12.



*Рис. 4.* Расщепление по альфа-амилазе отдельных зерен в популяции  $F_{\infty}$  33/12 озимой пшеницы (КСИ-12, БелНИИСХ): 1 – P<sub>1</sub>; 2–5 –  $F_{\infty}$  33/12; 6 – P<sub>2</sub>. Жирным шрифтом отмечены хромосомы, по которым наблюдается расщепление, в скобках символы аллелей

*Fig. 4.* Segregation by alpha-amylase individual grains in the population  $F_{\infty}$  33/12 winter wheat (Comp.Test-12, BelNIISKH): 1 – P<sub>1</sub>; 2–5 –  $F_{\infty}$  33/12; 6 – P<sub>2</sub>. Bold font marked chromosome on which a segregation. Brackets marked symbol of parent alleles

Родители отличались по двум зонам активности (см. рис. 4). У P<sub>1</sub> интенсивно выражен наименее подвижный компонент и отсутствовала ферментативная активность в зоне третьего (сверху) компонента, контролируемого длинным плечом хромосомы 6A. P<sub>2</sub> характеризовался наличием более слабой активностью в наименее подвижной зоне зимограммы, контролируемой длинным плечом хромосомы 6D и присутствием третьего компонента (сверху), контролируемого хромосомой 6A. В гомозиготной популяции  $F_{\infty}$  33/12 было обнаружено только два фенотипических класса, идентичных исходным родителям. Встречаемость их представлена в таблице 3.

Таблица 3  
Table 3

**Анализ расщепления по изоферментам альфа-амилазы в гомозиготных популяциях озимой пшеницы:  $F_{\infty}$  33/12 от сложного скрещивания и  $F_{\infty}$  38/12 (=Одесская 267 × Памяти Федина)**  
**Analysis of the segregation by alpha-amylase isoenzymes in homozygous populations of winter wheat:  $F_{\infty}$  33/12 from composite cross and  $F_{\infty}$  38/12 (=Odesskaya 267 × Pamyati Fedina)**

Популяция	Локус, контролирующий альфа-амилазу	Символы аллелей	Обозначение фенотипов		Размер выборки n	Ожидаемое соотношение	$\chi^2$	P
			XX	xx				
33/12	$\alpha$ -Amy A1	$B \times B_1$	30	37	67	1 : 1	0.732	>0.25
38/12	$\alpha$ -Amy A1	$B + ?$	59	14	73	1 : 1	27.75	<0.01
						3 : 1	1.32	=0.25
	$\alpha$ -Amy D1	$D + ?$	52	21	73	1 : 1	13.16	<0.01
						3 : 1	0.55	>0.25

Как видно, соотношение выявленных фенотипов соответствует расщеплению 1 : 1. Следовательно, выявленные различия обусловлены аллелями одного локуса. Характерно, что аллель обозначенный как  $B$ , локуса  $\alpha$ -Amy A1, контролирующий наличие компонента  $B$ , имеет альтернативный вариант,  $B_1$ , обуславливающий дополнительную активность в зоне наименее подвижного варианта альфа-амилазы  $B_1$ . Эти данные подтверждают результаты, полученные на комбинации  $F_{\infty}$  66/09 X Богданка. Таким образом, наименее подвижный компонент альфа-амилазы пшеницы, может контролироваться не только одним локусом  $\alpha$ -Amy-D1, но также дополнительными –  $\alpha$ -Amy A1, если он несет аллель  $B_1$ . Следовательно, изоэнзимы, контролируемые аллелями разных локусов, могут иметь идентичные электрофоретические параметры. Подтверждением этому может служить комбинация  $F_{\infty}$  38/12 (=Одесская 267 X Памяти Федина). На рисунке 5 представлены варианты фенотипических классов альфа-амилаз, встречающихся в данной гомозиготной популяции.

Встречаемость компонентов по зонам активности ферментов представлена в табл. 3. Как видно, наследование по каждой зоне активности ( $B$  и  $D$ ) имеет дигенный характер. Анализ наследования обоих компонентов показал, что присутствие ферментативной активности в обеих зонах одновременно к активности по каждой зоне отдельно составляет 2 : 1 : 1 (табл. 4). Такое соотношение возможно, если аллель  $B_1$  локуса  $\alpha$ -Amy A1 обуславливает синтез фермента идентичного по электрофоретической подвижности продукту  $D$  локуса  $\alpha$ -Amy D1. В этом случае, аллель  $D_1$  локуса  $\alpha$ -Amy D1 контролирует синтез варианта идентичного по электрофоретическим параметрам продукту  $B$  локуса  $\alpha$ -Amy A1. Таким образом, при этих условиях с учетом независимого наследования такое расщепление в  $F_{\infty}$  возможно. Судя по величине  $\chi^2$  (1.46;  $P > 0.25$ ) наблюдаемое отношение отмеченных фенотипических классов свидетельствует о независимом наследовании локусов, контролирующих синтез ферментов в этих зонах зимограмм. Кроме этого, подтверждается идентичность продуктов некоторых аллелей, изоэнзимам, контролируемым другими локусами.

Таблица 4  
Table 4

**Анализ сцепления локусов  $\alpha$ -Amy A1 и  $\alpha$ -Amy D1 в комбинации  $F_{\infty}$  38/12 (=Одесская 267 × Памяти Федина)**  
**Linkage analysis of loci  $\alpha$ -Amy A1 and  $\alpha$ -Amy D1 in combination  $F_{\infty}$  38/12 (=Odesskaya 267 × Pamyati Fedina)**

Символы локусов	Фенотипические классы в $F_{\infty}$			$\chi^2$	P
	BBDD + $B_1B_1 D_1D_1$	BB $D_1D_1$	$B_1B_1DD$		
$\alpha$ -Amy A1 + $\alpha$ -Amy D1	38	21	14	1.46	> 0.25

Таким образом, сложный генетический контроль изоферментного состава альфа-амилаз при массовом анализе не всегда позволяет установить полный аллельный состав, контролирующий синтез этого фермента в медленно подвижной зоне зимограмм.

В связи с этим, для оценки сопряженности изоэнзимного состава альфа-амилаз с количественными признаками и свойствами растений мягкой пшеницы имеются определенные сложности. Поэтому группировку растительного материала по данному ферменту проводили по зимотипам. Для этого обозначали зоны ферментативной активности буквами латинского алфавита в соответствии с рисунком 6.



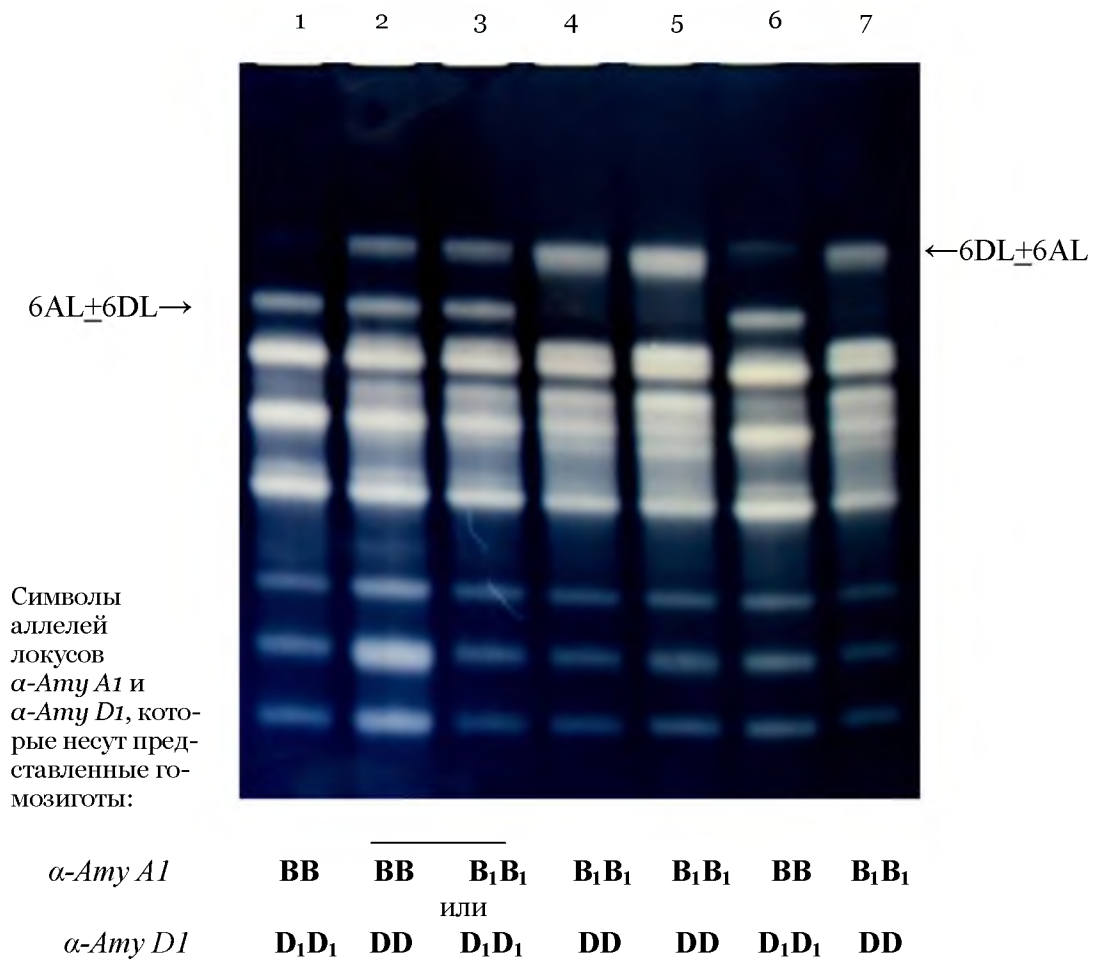


Рис. 5. Расщепление по альфа-амилазе отдельных зерен в популяции F<sub>∞</sub> 38/12 (=Одесская 267 X Памяти Федина) озимой пшеницы (КСИ-12, БелНИИСХ)  
 Fig. 5. Segregation by alpha-amylase in individual grain population F<sub>∞</sub> 38/12 (= Odesskaya 267 X Memory Fedina) of winter wheat (Comp.Test-12, BelNIISKH)

С учетом такой группировки альфа-амилазы проведена оценка сопряженности ряда количественных признаков с выявленными сочетаниями изоферментов (табл. 5).

Таблица 5  
 Table 5

**Анализ количественных признаков озимой мягкой пшеницы, отличающихся вариантами альфа-амилазы (КСИ-12, п. Гонки)**  
**The analysis of quantitative traits in winter wheat with different variants of alpha-amylase (Comp.Test-12, v. Gonki)**

Наличие вариантов $\alpha$ -амилазы	Число семей	Дата колошения в мае	Высота растения, см	Урожайность, ц/га	Проросшие зерна, %
A CY	20	16.6±0.2	73.8±2.0	43.1±1.3	16.9±4.4
A Y	12	16.1±0.2	80.0±2.3	43.4±1.9	16.4±5.5
A BCY	7	15.7±0.6	74.3±2.9	44.6±2.2	17.4±6.0
A* BCY	9	16.7±0.2	72.2±3.0	43.9±2.2	17.4±6.9
A CY+X	9	17.7±0.6	76.1±5.1	41.9±1.8	4.2±1.4
A* CY	4	17.0±0.4	77.5±3.2	45.8±2.6	7.5±5.2
A Y+X	5	18.0±0.8	76.0±4.0	52.1±9.7	7.6±4.7
CY	3	17.0±1.0	71.7±4.4	43.2±2.6	19.7±11.0
Безостые	11	16.6±0.3	80.5±3.5	41.9±1.8	7.6±4.1



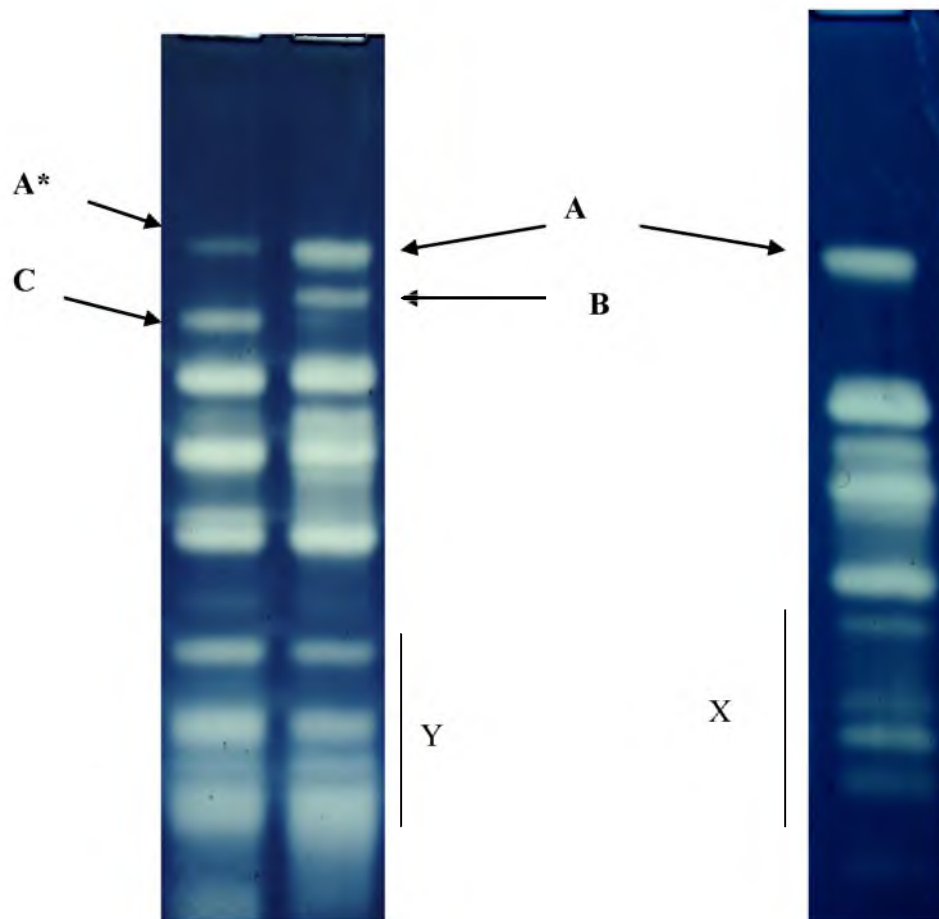


Рис. 6. Зимограммы альфа-амилазы мягкой пшеницы:  
буквами обозначены тестируемые в КСИ-12 варианты  
Fig. 6. Electrophoretic patterns alpha-amylase wheat:  
letters refer to the test in the Comp. Test-12 variants

Представленные генотипы в 2012 году существенно не отличались между собой по дате колошения, высоте растений и урожайности. Следует отметить, что в период созревания посевов в этом году наблюдалась достаточно длительная дождливая погода. Это привело к тому, что часть созревшего зерна наклюнулась. Соответственно, такое явление приводит к падению всхожести семенных партий пшеницы и снижению хлебопекарных свойств зерна, предназначенного для продовольственных целей. Так, согласно ГОСТ 9353-90, для пшеницы II и III класса качества, количество проросших зерен не должно превышать 3%. Для окончательного заключения о качестве полученной партии зерна пшеницы оценивают показатель «число падения», характеризующий амилолитическую активность муки данной партии (ГОСТ 30498-97). В связи с этим оценка относительной устойчивости к прорастанию в период уборки пшеницы является важным показателем наличия или отсутствия этого свойства создаваемых сортов озимой пшеницы. В табл. 5 представлены результаты анализа доли проросших зерен в анализируемом растительном материале. Как видно, генотипы, несущие следующие сочетания изоферментов альфа-амилаз: АСУ+Х, А\*СУ, АУ+Х показали несколько меньшее число проросших зерен. Оценка существенности выявленных различий представлена в таблице 6.

Жирным шрифтом отмечены величины, достоверно превышающие различия по прорастаемости между сравниваемыми генотипами. Как видно, генотип с сочетанием вариантов альфа-амилаз АСХУ имел существенно более низкий показатель прорастаемости зерна по сравнению с некоторыми другими генотипами. Следовательно, данное сочетание вариантов амилазы является ценным при создании сортов обладающих большей устойчивостью к прорастанию на корню.



Таблица 6  
Table 6

**Оценка достоверности различий (критерий *t*) по проросшим зернам (%) в уборанном урожае (2012 г.) между формами с разным сочетанием вариантов альфа-амилазы**  
**Evaluation the significance of differences (criterion *t*) in the sprouted grains (%) in harvested (2012), between the forms with different combinations of variants of alpha-amylase**

Сочетания	A*CY	A*BCY	ABCY	AY	AYX	CY	ACXY	Безостые
ACY	1.3	0.6	0.07	0.06	1.43	0.2	<b>2.75*</b>	1.55
A*CY		1.1	1.2	1.1	0.01	1.0	0.61	0.0
A*BCY			0.1	0.1	1.16	0.2	1.88	1.7
ABCY				0.1	1.26	0.2	<b>2.11*</b>	1.3
AY					1.21	0.3	<b>2.15*</b>	1.3
AYX						1.01	0.68	0.0
CY							1.39	1.0
ACXY								0.69

Примечание: \*, \*\* – различия существенны, соответственно, при  $P > 0.95$  и  $P > 0.99$ .  
Note: \*, \*\* – significant difference, respectively,  $P > 0.95$  and  $P > 0.99$ .

Характерно, что безостые формы (см. табл. 5) обнаружили тенденцию к большей устойчивости к прорастаню зерна в колосе. Так, образцы с остистых растений имели проращаемость зерна  $14.0 \pm 1.5\%$  ( $n=87$ ), а с безостых –  $7.6 \pm 4.1\%$  ( $n=11$ ). В то же время, различия между остистыми и безостыми формами по этому свойству находились в пределах ошибки опыта ( $t=1.46$ ;  $P < 0.95$ ). С целью более детального анализа наблюдаемых различий оценивали частоты встречаемости образцов имевших проросших зерен  $\leq 3.0\%$ . Среди остистых форм такие образцы составляли  $34.48\%$  ( $n=87$ ). Среди безостых номеров, выявлено  $72.72\%$  форм, отвечающих аналогичным параметрам ( $n=11$ ). В целом, оценка частот встречаемости образцов с низкой проращаемостью на корню дала, соответственно, следующие величины:  $0.3448 \pm 0.0509$  и  $0.7272 \pm 0.1343$ . Различия в частотах встречаемости таких форм между этими группами оказались существенными ( $t=2.66$ ;  $P > 0.95$ ). Ранее было показано [Нецветаев, Нецветаева, 2004], что у сортов озимой пшеницы отечественной селекции безостость контролируется одним доминантным геном. Тест на аллельность не выявил дополнительных влияющих на этот признак. Следовательно, судя по этим данным, наиболее распространенный доминантный локус *V1* (безостость) ассоциирован с геном(ами), обуславливающим низкую реакцию на проращаемость зерна при созревании.

Анализ сопряженности альтернативных вариантов альфа-амилазы с количественными признаками в 2012 году представлен в таблице 7.

Таблица 7  
Table 7

**Оценка сопряженности вариантов альфа-амилазы мягкой озимой пшеницы с некоторыми количественными признаками в 2012 г.**  
**Evaluation contumacy variants of alpha-amylase soft winter wheat with some quantitative traits in 2012**

Символы вариантов альфа-амилазы	n	Дата колошения в мае	Высота растений, см	Урожайность, ц/га	Проросшие зерна, %
A	39	$16.9 \pm 0.3$	$74.1 \pm 1.7$	$42.7 \pm 0.9$	$12.9 \pm 2.5$
A*	13	$16.9 \pm 0.2$	$74.6 \pm 2.4$	$45.2 \pm 1.5$	$13.2 \pm 4.7$
НСР <sub>0.95</sub>		1.1	5.9	3.5	10.3
t		0.07	0.16	1.42	0.05
B	17	$16.4 \pm 0.3$	$72.4 \pm 2.1$	$43.8 \pm 1.5$	$15.5 \pm 4.2$
b	42	$16.9 \pm 0.2$	$75.5 \pm 1.5$	$43.3 \pm 0.9$	$12.5 \pm 2.3$
НСР <sub>0.95</sub>		0.8	5.2	3.5	9.5
t		1.19	1.20	0.29	0.63
C	47	$16.7 \pm 0.2$	$74.3 \pm 1.5$	$43.4 \pm 0.8$	$14.5 \pm 2.3$
c	14	$16.8 \pm 0.4$	$76.6 \pm 1.9$	$43.8 \pm 1.7$	$11.2 \pm 3.5$
НСР <sub>0.95</sub>		1.0	4.9	3.8	8.4
t		0.09	0.97	0.22	0.79
Y	55	$16.4 \pm 0.1$	$75.1 \pm 1.2$	$43.7 \pm 0.8$	$13.8 \pm 2.1$
Y+X	14	$17.8 \pm 0.5$	$76.1 \pm 3.5$	$42.6 \pm 1.4$	$6.1 \pm 2.2$
НСР <sub>0.95</sub>		1.0	7.3	3.2	6.1
t		<b>2.78**</b>	0.271	0.67	<b>2.51*</b>



В данном случае заглавная буква обозначает активный фермент, прописная – отсутствие ферментативной активности в этой зоне зимограммы. Как видно, в 2012 году не обнаружена достоверная связь изученных количественных показателей с альтернативными вариантами фермента. За исключением зимотипа X, с которым связано более позднее наступление фазы колошения. В то же время, отсутствие активности в зонах B и C показало тенденцию на уменьшение прорастаемости зерна. Существенное снижение прорастаемости семени на корню обусловлено присутствием зимотипа X, который контролируется двумя кодоминантными аллелями локусов  $\alpha$ -Amy-B6 и  $\alpha$ -Amy-B7.

В 2013 году продолжили исследования по оценке сопряженности вариантов альфа-амилазы с количественными признаками. Полученные результаты демонстрируют таблицы 8 и 9.

Таблица 8  
Table 8

**Анализ количественных признаков мягкой озимой пшеницы, отличающихся изоферментами альфа-амилазы (КСИ-13, п. Гонки)**  
**The analysis of quantitative traits of soft winter wheat with different isoenzymes alpha-amylase (Comp.Test-13, v. Gonki)**

Наличие изоферментов $\alpha$ -амилазы	Число семей	Дата колошения в мае	Высота растения, см	Урожайность, ц/га
A CY	13	18.6±0.3	82.3±2.8	37.0±1.2
A Y	7	18.7±0.6	78.6±3.6	37.9±2.9
A BCY	5	18.6±0.5	81.0±5.1	39.7±1.3
A* BCY	5	18.8±0.4	86.0±2.5	40.9±1.6
A CY+X	6	20.3±0.8	76.7±8.9	33.8±2.7
A* CY	3	19.7±0.9	76.7±7.3	41.0±3.6
A Y+X	5	20.4±0.5	88.0±4.6	43.3±3.9

Таблица 9  
Table 9

**Оценка сопряженности вариантов альфа-амилазы мягкой озимой пшеницы с некоторыми количественными признаками в 2013 г.**  
**Evaluation contingency variants of alpha-amylase of soft winter wheat with some quantitative traits in 2013**

Символы вариантов альфа-амилазы	n	Дата колошения в мае	Высота растений, см	Урожайность, ц/га
A	32	19.0±0.3	84.2±1.8	39.3±0.9
A*	8	19.1±0.4	82.5±3.2	41.0±1.5
НСР <sub>0.95</sub>		0.9	7.7	3.7
t		0.27	0.46	0.92
B	10	18.7±0.3	83.5±2.8	40.3±1.0
b	30	19.1±0.3	82.8±1.8	39.6±1.1
НСР <sub>0.95</sub>		0.8	6.8	3.1
t		0.91	0.22	0.51
C	30	18.9±0.2	83.5±1.9	38.7±0.8
c	10	19.2±0.5	85.0±2.7	42.4±2.1
НСР <sub>0.95</sub>		1.1	6.8	4.7
t		0.61	0.45	1.63
Y	35	18.8±0.2	81.7±1.6	38.5±0.8
Y+X	11	20.4±0.5	81.8±5.4	38.1±2.6
НСР <sub>0.95</sub>		1.0	11.3	5.6
t		<b>3.01**</b>	0.02	0.15

Примечание: заглавная буква – наличие активности, строчная – отсутствие активности; \*\* – значим при P>0.99.

Note: capital letter – for activity, small letter – the lack of activity; \*\* – significant at P>0.99.

В 2013 году также в целом не обнаружено связи между генотипами, имеющими разные сочетания изоферментов альфа-амилазы и приведенными количественными признаками (см. табл. 8). В этом году условия вегетации были благоприятны для формирования полноценного зерна. Прорастания зерен в колосе не наблюдалось. В такие годы невозможно оценить растительный материал на устойчивость к прорастанию зерна на корню. В то же время, изоферментный анализ альфа-амилазы позволяет целенаправленно вести отбор по этому свойству.



Данные таблицы 9 свидетельствуют о том, что присутствие варианта X альфа-амилазы существенно удлиняло начало даты колошения, что согласуется с результатами предшествующего года.

### Заключение

Таким образом, установлено, что полиморфизм изоферментного состава альфа-амилазы мягкой пшеницы ограничивается присутствием разных локусов, продукты которых близки по электрофоретическим параметрам. В связи с этим, один компонент энзима может контролироваться как одним, так и двумя или тремя генами.

Идентифицирован локус, контролирующий изоэнзим E альфа-амилазы в быстро подвижной части электрофореграммы, обозначенный как  $\alpha$ -Amy-V7. Он расположен в хромосоме 6BL на расстоянии  $0.95 \pm 0.39\%$  рекомбинации от фактора  $\alpha$ -Amy-V6.

С целью создания новых сортов озимой мягкой пшеницы, обладающих большей устойчивостью к прорастанию зерна в колосе целесообразно вести отбор генотипов с сочетанием вариантов альфа-амилазы: АСУХ. В целом, присутствие гена V1 (Безостость) и кодоминантных аллелей локусов  $\alpha$ -Amy-V6 и  $\alpha$ -Amy-V7, расположенных в хромосомах 5A и 6BL, обуславливает снижение степени прорастания зерна в колосе. Использование данных генетических маркеров может быть эффективно в связи с тем, что погодные условия вегетационного периода не всегда способствуют проявлению этого количественного признака.

Присутствие активных аллелей локусов  $\alpha$ -Amy-V6 и  $\alpha$ -Amy-V7 приводит к задержке времени колошения растений. В то же время, особенности изоферментного состава альфа-амилазы не влияют на рост растений и урожайность в условиях Белгородской области.

### Список литературы References

1. ГОСТ 9383-90 Пшеница. Требования при заготовках и поставках. Дата введения 01.07.1991. GOST 9383-90 Wheat. Requirements for purchases and deliveries. Date of introduction 01.07.1991. (in Russian)
2. ГОСТ 30498-97 Зерновые культуры. Определение числа падения. Дата введения 01.07.1998. GOST 30498-97 Cereals. Determining the number of falls. Date of introduction 01.07.1998. (in Russian)
3. Илличевский Н.Н., Метакровский Е.В., Созинов А.А. 1989. Полиморфизм и генетический контроль  $\alpha$ -амилазы у отечественных сортов яровой мягкой пшеницы. Генетика, 25 (12): 2176–2186. Illichevsky N.N., Metakovskiy E.V., Sozinov A.A. 1989. Polymorphism and genetic control of  $\alpha$ -amylase from domestic varieties of spring wheat. Genetika [Russian Journal of Genetics], 25 (12): 2176–2186. (in Russian)
4. Нещетаев В.П., Нещетаева О.В. 2004. Выявление наследственной изменчивости зерновых по зимостойкости. Генетика, 40 (11): 1502–1508. Netsvetaev V.P., Netsvetaeva O.V. 2004. Identification of genetic variation for cereals hardiness. Genetika [Russian Journal of Genetics], 40 (11): 1502–1508. (in Russian)
5. Нещетаев В.П. 2008. Руководство по генетическому анализу растений. Белгород, БелГУ, 34. Netsvetaev V.P. 2008. Rukovodstvo po geneticheskomu analizu rastenij [Manual for genetic analysis of plants]. Belgorod, BelGU, 34. (in Russian)
6. Нещетаев В.П., Акиншина О.В., Бондаренко Л.С. 2012. Генетический контроль некоторых изоферментов альфа-амилазы озимой мягкой пшеницы. Генетика, 48 (3): 401–404. Netsvetaev V.P., Akinshina O.V., Bondarenko L.S. 2012. Genetic control of several  $\alpha$ -amylase isoenzymes in winter hexaploid wheat. Genetika [Russian Journal of Genetics], 48 (3): 401–404.
7. Рыбалка А.И., Боделан О.П., Литвиненко Н.А. 1989. Генетический анализ  $\alpha$ -амилазы зерна пшеницы. Генетика, 25 (12): 2187–2198. Rybalka A.I., Bodelan O.P., Litvinenko N.A. 1989. Genetic analysis of  $\alpha$ -amylase wheat. Genetika [Russian Journal of Genetics], 25 (12): 2187–2198. (in Russian)
8. Ainsworth C.C., Doherty P., Edwards K.G.K., Martienssen R.A., Gale M.D. 1985. Allelic variation at  $\alpha$ -Amylase loci in hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics, 70: 400–406.
9. Gale M.D., Law C.N., Chojecki A.J., Kempton R.A. 1983. Genetic control of  $\alpha$ -amylase production in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 64: 309–316.
10. Mrva K., Mares D.J. 1999. Regulation of high pI alpha-amylase synthesis in wheat aleurone by a gene(s) located on chromosome 6B. Euphytica, 109: 17–23.
11. Netsvetaev V.P., Sozinov A.A. 1984. Location of a hordein G locus, Hrd G, on chromosome 5 of barley. Barley Genetics Newsletter, 14: 4–6.
12. Nishikawa K., Nobuhara M. 1971. Genetic studies on  $\alpha$ -amylase isozymes in wheat 1. Location of genes and variation in tetra- and hexaploid wheat. Japanese Journal of Genetics, 46: 345–358.
13. Nishikawa K. 1991. Chromosome mapping by use of aneuploids in wheat. Wheat Information Service, 72: 60–63.
14. Nishikawa K., Ban T., Furuta Y. 1993. Telocentric mapping of alpha-amylase loci in wheat. Wheat Information Service, 77: 39–45.