

# ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОФЕРМЕНТОВ БЕТА-АМИЛАЗЫ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

В.П. НЕЦВЕТАЕВ, доктор биологических наук, зав. лабораторией

Л.С. БОНДАРЕНКО, младший научный сотрудник

О.В. АКИНШИНА, младший научный сотрудник

Белгородский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, ул. Октябрьская, 58, Белгород, 308001, Россия

E-mail: v.netsvetaev@yandex.ru

**Резюме.** На основе анализа  $F_2$ , полученного в результате гибридизации сорта пшеницы *Pyrotrix* с изогенными линиями, которые были созданы на базе сорта Новосибирская 67, устанавливали хромосомы критические в отношении генетического контроля изоферментов бета-амилазы. Разделение бета-амилаз проводили в трис-глицериновой системе полиакриламидного геля (рН 8,3). Для идентификации локуса  $\beta$ -Аму-А1 маркировали хромосому 5AL генетическим фактором *V1b1* (безостость/остистость). Для определения локуса  $\beta$ -Аму-D1, хромосому 4DL маркировали геном *Rht 2*. В таких условиях электрофореза спектр бета-амилазы сорта *Pyrotrix* разделялся на три зоны активности, обозначенных в соответствии с ростом подвижности символами от А до С и D. Спектр бета амилаз сорта Новосибирская 67 обеднен и занимает промежуточную зону подвижности – В. Сдвоенный компонент А бета-амилазы сорта *Pyrotrix* контролируется локусом  $\beta$ -Аму-А1, который расположен на расстоянии  $13,70 \pm 3,37\%$  рекомбинации от фактора *V1b1* (безостость/остистость). Наиболее подвижный сдвоенный компонент D этого сорта показал сцепление с локусом *Rht 2*, ответственным за рост растений пшеницы, на уровне  $38,89 \pm 4,75\%$  рекомбинации. Генетический анализ компонента В, находящегося под дигенным контролем, дал близкую величину сцепления бета-амилазного фактора с геном *Rht 2* равную  $33,40 \pm 10,31\%$  рекомбинации. Следовательно, компонент D сорта *Pyrotrix* находится под контролем локуса  $\beta$ -Аму-D1.

**Ключевые слова:** изоферменты бета-амилазы, мягкая пшеница, сцепление генов, хромосомный контроль, рекомбинация, сорт *Pyrotrix*.

**Для цитирования:** Невцетаев В.П., Бондаренко Л.С., Акиншина О.В. Генетический анализ изоферментов бета-амилазы мягкой пшеницы // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т.29. № 4. С. 17-19.

Согласно данным ряда исследователей [1, 2, 3] изоферменты бета-амилазы контролируют три локуса  $\beta$ -Аму-А1,  $\beta$ -Аму-В1,  $\beta$ -Аму-D1, расположенные соответственно в хромосомах 5AL, 4BL, 4DL. При разделении этих энзимов для генетического анализа упомянутые авторы использовали изоэлектрофокусирование. В то же время, обычный электрофорез – более экономичный и достаточно эффективный метод при проведении массовых анализов. Учитывая, что методика разделения фермента меняет его спектр, необходим дополнительный генетический анализ для идентификации локусов, ответственных за их синтез. Это и стало целью наших исследований.

## Условия, материал и методы.

Для идентификации локуса  $\beta$ -Аму-А1 хромосому 5AL маркировали генетическим фактором *V1b1* (безостость vs. остистость), локуса  $\beta$ -Аму-D1 – хромосому 4DL маркировали геном *Rht 2*. На основе оценки сцепления локусов, контролирующих изоферменты бета-амилазы, с маркерными генами устанавливали за какие изоэнзимы

электрофоретического спектра ответственны те или иные хромосомы пшеницы.

Материалом для исследования послужили две гибридные комбинации мягкой пшеницы  $F_2$  *Pyrotrix* × АНК-14А и  $F_2$  АНК-12 × *Pyrotrix*. Родительские формы АНК-12 и АНК-14А, полученные от С.Ф. Коваля (Новосибирск) – это почти изогенные линии сорта Новосибирская 67, несущие, соответственно, рецессивные гены *rht2* (полукарликовость) и *b1* (остистость).

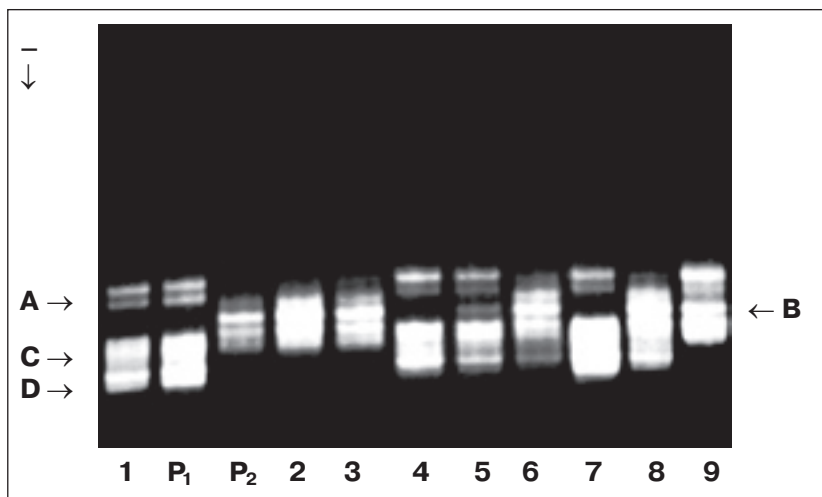
Короткостебельность линии АНК-12 обусловлена введением в геном рецессивного фактора *rht2* от японского сорта *Norin 10* [4], описание которого дано ранее [5]. Остистость АНК-14А обусловлена геном *b1* [4], расположенным в хромосоме 5А [6].

Бета-амилазы выделяли из созревших зерен. Разделение энзимов осуществляли с помощью вертикального электрофореза в пластинах полиакриламидного геля, рН 8,3 [7].

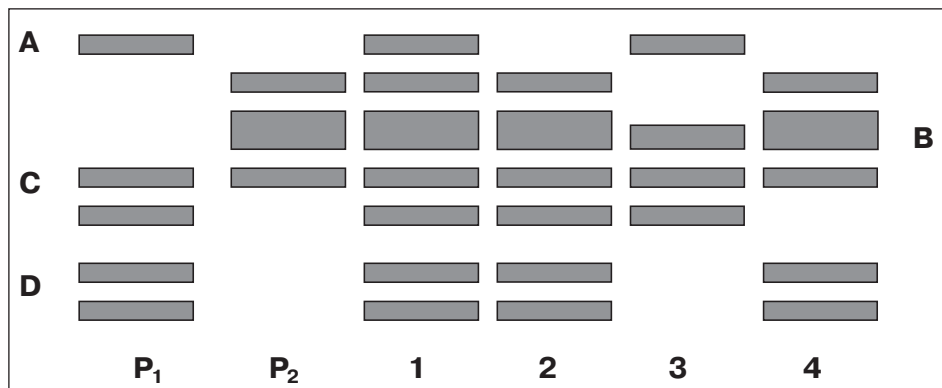
Для генетического анализа пользовались критерием  $\chi^2$  [8-10]. Оценку сцепления между генами осуществляли методом максимального правдоподобия на основе уравнений и формул описанных ранее [11].

**Результаты и обсуждения.** Сопоставление спектров зимотипов бета-амилаз родителей и расщепляющегося потомства  $F_2$  свидетельствует о том, что различия в электрофореграммах затрагивают все зоны активности фермента (рис. 1 и 2) – по энзиматическим зонам, обозначенным главными буквами, наблюдалось расщепление.

Результаты расщепления по генетическим факторам, которые контролируют изоферменты бета-амилазы и остистость колоса в комбинации  $F_2$  *Pyrotrix* × АНК-14А, свидетельствуют о том, что наименее подвижный сдвоенный компонент фермента, обозначенный символом А, показал моногенный тип наследования. Синтез энзима В контролировали два гена. На зону активности бета-амилазы, обозначенную символом С, также влияют два локуса. Наиболее подвижный сдвоенный компонент D фермента, судя по расщеплению (табл. 1), контролирует один генетический фактор. Результаты оценки расщепления по признаку безостость vs. остистость (*V1b1*) в  $F_2$  *Pyrotrix* × АНК-14А подтвердили моногенный тип наследования (табл. 1).



**Рис. 1.** Зимограммы бета-амилаз мягкой пшеницы: 1-9 –  $F_2$  АНК-12 × *Pyrotrix*,  $P_1$  – *Pyrotrix*,  $P_2$  – (*rht2*). Буквы обозначают символы зон активности фермента.



**Рис. 2.** Схемы изоферментов бета-амилазы мягкой пшеницы: P<sub>1</sub> – Pyrotrix; P<sub>2</sub> – АНК-14А (Новосибирская 67); 1-4 – некоторые варианты фермента в F<sub>2</sub>

Известно, что ген *b1* расположен в длинном плече хромосомы 5А на расстоянии 2,3±2,3% рекомбинации от локуса β-Аму-А1 [1, 6]. В связи с этим, было оценено

Полученные данные подтвердили наши предположения о том, что различия в активности фермента в зоне А обусловлены аллелями одного гена, а в зоне В – аллелями по двум локусам.

**Таблица 1.** Расщепление изоферментов по генетическим факторам

Символы аллелей Y vs. y	Фенотипические классы в F <sub>2</sub>		χ <sup>2</sup> <sub>3:1</sub>	χ <sup>2</sup> <sub>15:1</sub>
	Y	y		
A × a	107	25	<b>2,59</b>	36,28
B × b	119	13	16,16	<b>2,91</b>
C × c	119	13	16,16	<b>2,91</b>
D × d	98	34	<b>0,04</b>	85,73
B1 × b1	108	24	<b>3,27</b>	32,07

сцепление локусов, контролирующих разные изоферменты бета-амилазы, с фактором *b1* в представленной комбинации скрещивания (табл. 2).

Для изофермента D установлен моногенный тип наследования, которому соответствовало расщепление по высоте растения (табл. 3).

Результаты оценки сцепления локусов, ответственных за синтез бета-амилазы, с геном *Rht2* свидетельствуют,

что locus, ответственный за синтез изоэнзима D, показал сцепленное наследование с высотой растений. Сцепление между геном *Rht2* и locusом, контролирующим синтез

**Таблица 2.** Оценка сцепления локусов, контролирующих синтез изоферментов бета-амилазы (X-β), и фактора B1b1 в комбинации F<sub>2</sub> Pyrotrix x АНК-14А

Символы аллелей A × B a b	Фенотипы в F <sub>2</sub>			Фаза	χ <sup>2</sup> <sub>L</sub>	Процент рекомбинации
	A_	B_	bb			
A-β × B1 a-β b1	A_	100	7	притяж.	25,52	13,70±3,37
	aa	8	17			
A-β × D-β a-β d-β	A_	84	23	притяж.	3,63	независимая
	aa	14	11			
C-β × A-β c-β a-β	A-, X-, --	107	12	притяж.	72,45	0,00±2,51
	aa, X-, --	0	13			
B-β × B1 b-β b1	A-, X-, --	95	24	отталкив.	4,99	0,28±17,41
	aa, X-, --	13	0			

Результаты проведенных исследований указывают на то, что расщепление между изоэнзимом А и признаком остистость vs. безостость не подчиняется независимому наследованию соответствующему отношению 9:3:3:1 (χ<sup>2</sup><sub>0</sub> = 31,38; P < 0,01). Поэтому критерий χ<sup>2</sup><sub>L</sub> = 25,52 и подтверждает эффект сцепления генов. Полученное расщепление продемонстрировало сцепление между locusами, контролирующими вариант энзима А, с геном *b1* величиной в 13,70±3,37% рекомбинации. Таким образом, очевидно, что этот зимотип контролирует locus β-Аму-А1, расположенный в хромосоме 5АЛ. Судя по оценке сцепления генетических факторов, ответственных за синтез компонентов в зонах В и С, с геном контролирующим изоэнзим А (см. табл. 2), можно сделать вывод, что одни из генов, ответственных за различия в активности в этих зонах, аллелен locusу, контролирующему изофермент А.

бета-амилазы в зоне D, находится на уровне 38,89±4,75% рекомбинации (табл. 4). Величина сцепления одного из генов, контролирующих изофермент В, была близкой по значению и равна 33,40±10,31% рекомбинации.

Следовательно, за синтез изофермента D ответственен locus β-Аму-D1, расположенный в хромосоме 4DL. Альтернативный аллель этого locusа, наряду с locusом β-Аму-А1, ответственен за синтез бета-амилазы в зоне В.

**Выводы.** Таким образом, за синтез изофермента D, сорта Pyrotrix, ответственен locus β-Аму-D1, расположенный в хромосоме 4DL на расстоянии около

**Таблица 3.** Расщепление по генетическим факторам, контролирующим изоферменты бета-амилазы и высоту растения (ген *Rht2*) в комбинации F<sub>2</sub> АНК-12 X Pyrotrix

Символы аллелей Y vs. y	Фенотипические классы в F <sub>2</sub>		χ <sup>2</sup> <sub>3:1</sub>	χ <sup>2</sup> <sub>15:1</sub>	χ <sup>2</sup> <sub>63:1</sub>
	Y	y			
A × a	140	52	<b>0,44</b>	142,22	813,03
B × b	180	12	36,00	<b>0,00</b>	27,43
D × d	138	54	<b>1,00</b>	156,80	880,76
<i>Rht2</i> × <i>rht2</i>	156	36	<b>4,00</b>	51,2	368,76

Таблица 4. Оценка сцепления локусов, контролирующих синтез изоферментов бета-амилазы (Х-β), и фактора *Rht2* в комбинации F<sub>2</sub> АНК-12 × Pyrotrix

Символы аллелей A x B a b	Фенотипы в F <sub>2</sub>			Фаза	X <sup>2</sup> <sub>L</sub>	Процент рекомбинации
	A_	B_	bb			
A-β x <i>Rht2</i> a-β x <i>rht2</i>	A_	115	25	притяж.	0,14	независимая
D-β x <i>Rht2</i> d-β x <i>rht2</i>	aa	41	11			
B-β x <i>Rht2</i> b-β x <i>rht2</i>	A_	118	20	притяж.	5,49	38,89±4,75
	aa	38	16			
	A-C,-,-	147	33	притяж.	89,87	33,40±10,31
	aaC,-,-	9	3			

36% рекомбинации от гена *Rht2*. Изофермент А бета-амилазы этого сорта, контролируется локусом β-Аmy-A1, который находится в хромосоме 5AL на расстоянии 13,7% рекомбинации от гена *b1*.

Сорт Pyrotrix может служить тестером для идентификации аллельных вариантов изоферментов бета-амилазы у различных форм мягкой пшеницы, контролируемых локусами β-Аmy-A1 и β-Аmy-D1.

**Литература.**

1. Ainsworth C.C., Gale M.D., Baird S. The genetics of beta-amylase isozymes in wheat. Allelic variation among hexaploid varieties and intrachromosomal gene locations // *Theoretical and Applied Genetics*. 1983. V. 66. P. 39–49.
2. Sharp P.J., Desai S., Gale M.D. Isozyme variation and RFLPs at the beta-amylase loci in wheat // *Theoretical and Applied Genetics*. 1988. V. 76. P. 691–699.
3. McIntosh R.A., Hart G.E., Devos K.M., Gale M.D., Rogers W.J. Catalogue of gene symbols for wheat // *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium. Saskatchewan, 1998. V. 5. P. 88. 155–156.*
4. Коваль С.Ф., Коваль В.С., Шаманин В.П. Изогенные линии пшеницы. Монография. Омск: Омскбланкиздат, 2001. 152 с.
5. McVittie J.A., Gale M.D., Marshall G.A., Westcott B. The intra-chromosomal mapping of the Norin 10 and Tom Thumb dwarfing genes // *Heredity*. 1978. V. 40. P. 67–70.
6. McIntosh R.A., Hart G.E., Devos K.M., Gale M.D., Rogers W.J. Catalog of gene symbols for wheat // *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium. Saskatchewan, 1998. V. 5. 235 p.*
7. Нецветаев В.П., Акиншина О.В., Бондаренко О.С., Моторина И.П. Полиморфизм по бета-амилазе зерна озимой мягкой пшеницы // *Генетика*. 2012. Т. 48. №2. С. 168–174.
8. Persson G. An attempt to find suitable genetic markers for dense ear loci in barley. I. // *Hereditas*. 1969. V. 62. P. 25–96.
9. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. Минск: Высшейшая школа. 1974. С. 7–442.
10. Нецветаев В.П. Руководство по генетическому анализу растений. Учеб.-метод. пособие. Белгород: БелГУ, 2008. 35 с.
11. Allard R.W. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity // *Hilgardia*. 1956. V. 24. No. 10. P. 235–278.

**GENETIC ANALYSIS OF ISOENZYMES OF BETA-AMYLASE IN SOFT WHEAT**

V.P. Netsvetaev, L.S. Bondarenko, O.V. Akinshina

Belgorod State Research Institute of Agriculture, Oktyabr'skaya str., 58, Belgorod, 308001, Russia

**Summary.** The chromosomes, which are crucial for the genetic control of isoenzymes of beta-amylase, were determined based on the analysis of F<sub>2</sub>. This generation was obtained by hybridization of spring wheat variety Pyrotrix with isogenic lines, developed on the basis of variety Novosibirskaya 67. Separation of beta-amylases was performed in Tris-glycine polyacrylamide gel system (pH 8.3). To identify beta-Amy-A1 locus we marked the chromosome 5AL by genetic factors B1b1 (baldness vs. beardedness). To determine locus beta-Amy-D1, the chromosome 4DL was marked by gene *Rht 2*. Under these conditions, electrophoresis spectrum of beta-amylase of variety Pyrotrix divided into three areas of activity designated in accordance with the increase in the mobility as symbols from A to C and D. The spectrum of beta-amylases of variety Novosibirskaya 67 depleted and occupied an intermediate zone of mobility – B-zone. The dual component A of beta-amylase of variety Pyrotrix is controlled by locus beta-Amy-A1, located at a distance of 13.70 ± 3.37 % recombination to factors B1b1 (baldness vs. beardedness). The most mobile dual component D of this variety showed linkage with *Rht 2* locus, responsible for the growth of wheat plants, at the level of 38.89 ± 4.75 % recombination. Genetic analysis of component B, which is under control of two loci, showed the close value of linkage of beta-amylase gene with *Rht2* factor, 33.40 ± 10.31 % recombination. Consequently, the component D of variety Pyrotrix is controlled by beta-Amy-D1 locus.

**Key words:** beta-amylase isoenzymes, soft wheat, linkage of genes, chromosome control, recombination, variety Pyrotrix.

**Author details:** V.P. Netsvetaev, Dr. Sc. (Biol.), Head of Laboratory (e-mail: v.netsvetaev@yandex.ru); L.S. Bondarenko, Junior Researcher; O.V. Akinshina, Junior Researcher

**For citation:** Netsvetaev V.P., Bondarenko L.S., Akinshina O.V. Genetic analysis of isoenzymes of beta-amylase in soft wheat. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2015. T. 29. № 4. pp. 17-19 (In Russ)

**ИНФОРМАЦИЯ**

**РОССЕЛЬХОЗБАНК ПРОФИНАНСИРОВАЛ СТРОИТЕЛЬСТВО КРУПНОГО АГРОКОМПЛЕКСА В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ**

При финансовой поддержке ОАО «Россельхозбанк» в Воронежской области введена в эксплуатацию вторая очередь крупнейшего в региональном АПК инвестиционного проекта по созданию свиного комплекса, который реализует группа компаний «АГРОЭКО». Общий объем кредитных вложений банка в проект составит порядка 10 млрд руб.

В июне 2013 г. ГК «АГРОЭКО» завершила первый этап инвестпроекта, построив три свиноводческих комплекса общей мощностью 300 тыс. гол. в год. В рамках второй очереди банк профинансировал строительство еще двух свиного комплексов общей мощностью 200 тыс. гол. в год, завода по производству комбикормов (40 т/ч) и зернохранилища (до 60 тыс. т).

Инвестиционный проект группы компаний «АГРОЭКО» - один из крупнейших в регионе, включен в Программу социально-экономического развития Воронежской области со статусом «особо значимый». Благодаря его реализации было создано 1200 новых рабочих мест, из них 1070 – на селе. По итогам 2014 г. ГК «АГРОЭКО» вошла в число 20 крупнейших производителей свинины в Российской Федерации.

По материалам Управления общественных связей ОАО «Россельхозбанк»