

ЗЛАЦКАЯ А.В.

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: zlatska@hotmail.com*

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ
SSR-МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С QTL СОДЕРЖАНИЯ
БЕЛКА В ЗЕРНЕ У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ,
ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭТОГО ПРИЗНАКА У СОРТОВ,
КУЛЬТИВИРУЮЩИХСЯ В УКРАИНЕ**

Признак “содержание белка в зерне” (СБЗ) является одним из наиболее важных признаков, определяющих хозяйственно-ценные качества мягкой пшеницы. Известно, что он, как и преимущественное большинство количественных признаков, достаточно сложен для генетических исследований из-за значительного влияния на это экспрессию абиотических и биотических факторов [1]. Тем не менее, в последнее десятилетие, при использовании специально созданного генетического материала и при помощи молекулярно-генетических маркеров (преимущественно SSR) были идентифицированы некоторые QTL (локусы количественных признаков) признака СБЗ как у мягкой, так и у твердой пшеницы. Эти работы подтвердили сложившиеся еще в 80–90-х годах XX столетия представления о том, что на признак СБЗ не влияет аллельный состав запасных белков, а этот признак контролируется другими генами регуляторного типа, расположенными и на других хромосомах [см. обзор 1]. Одним из первых маркеров этого признака оказался микросателлитный маркер *wmc 41*, расположенный на хромосоме 2DL мягкой пшеницы и маркирующий QTL определяющий до 18,73% генетической изменчивости по этому признаку при исследовании популяции рекомбинантно-инбредных (РИЛ) и почти изогенных линий [2,3]. Следующим был идентифицирован маркер *wmc 415*, расположенный на хромосоме 5AS и определяющий 6,21% генетической изменчивости по этому признаку на популяции почти изогенных линий мягкой пшеницы, полученных в Индии [4]. В последующих исследованиях были идентифицированы и другие локусы на других хромосомах. Преимущественно это были хромосомы 2-й гомеологической группы, 3DS, 4AL, 6BS, 7AS и 7DS [3]. Причем, в разных группах линий, не все идентифицированные локусы проявляли один и тот же эффект. Чаще всего и практически во всех случаях было установлено позитивное влияние локусов, контролирующих СБЗ, расположенных на хромосомах 2-й гомеологической группы. Возможно, этот факт, связанный с тем, что на хромосомах этой гомеологической группы расположены гены азотного обмена [5]. У твердой же пшеницы локус, характеризующий высокое СБЗ, был четко маркирован на хромосоме 6BS [6]. В данном исследовании мы использовали микросателлиты, маркирующие богатые генами регионы ДНК, связанные с устойчивостью к ряду патогенов и одними из первых показавшие связь с проявлением признака СБЗ: *wmc 41* хромосома 2 DL и *wmc 415* хромосома 5A и 5B [2-4] с целью

оценки эффективности использования этих маркеров для прогнозирования показателя содержания белка в зерне у озимой мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужил 51 сорт озимой мягкой пшеницы: Мирхад, Мироновская 33, Находка 4, Цыганка, Харус, Зира, Палма, Ларс, Белоцерковская полукарликовая, Мироновская 65, Ясочка, Украинка одесская, Доля, Збруч, Дальницкая, Застава одесская, Красуня одесская, Селянка, Херсонская остистая, Василина, Вдала, Зимоярка, Скарбныця, Веста, Херсонская безостая, Сирена одесская, Фишт, Астет, Шестопаловка, Добирна, Дриада 1, Ремесливна, Спиванка, Куяльник, Юна, Кирия, Мироновская 61, Свитанок 1, Знахидка одесская, Украинка полтавская, Диканька, Победа 50, Мироновская раннеспелая, Подолянка, Ятрань 60, Панна, Киевская остистая, Пивная, Одесская 132, Коломак 5, Донецкая 46.

Методы. СБЗ определяли на приборе Инфратек фирмы “Foss Tecator”. Экстракцию ДНК проводили с использованием СТАВ метода [7]. ПЦР и визуализацию продуктов амплификации проводили согласно методике Редер и др. [8]. Продукты амплификации разделяли в 2% агарозном геле, а визуализацию проводили в ультрафиолетовом свете с использованием бромистого этидия. Оценку размеров ампликонов проводили с использованием специализированной программы Totalab. Обработку результатов проводили согласно методам вариационной статистики [9].

Результаты и обсуждения

Для определения эффективности использования микросателлитных маркеров wmc 41 и wmc 415 с целью прогнозирования показателя СБЗ у мягкой пшеницы Украины на первом этапе исследования были отобраны образцы 51 сорта, оказавшихся однородными или имеющими прогнозируемое количество биотипов на основании анализа запасных белков. В течение нескольких лет их культивировали и определяли СБЗ. Полученные результаты были усреднены и на их основании, используя методы вариационной статистики, все сорта были поделены на статистические классы (рис. 1). Первый класс объединял сорта с СБЗ в пределах 11,9–12,4%; 2-й — 12,5–13,0%; 3-й — 13,1–13,54%; 4-й — 13,55–14,08%; 5-й — 14,09–14,62%; 6-й — 14,63–15,16%; 7-й — 15,17–15,7%; 8-й — 15,8–16,24% и 9-й — 16,25–16,79%. После этого были отобраны по 20 растений каждого сорта, проведена экстракция ДНК и затем ПЦР анализ с использованием праймеров к двум микросателлитным маркерам wmc 415 (рис. 2) и wmc 41 (рис. 3).

Оба маркера показали высокий уровень полиморфизма. У wmc 415 идентифицировали 8 аллелей, а у wmc 41 — 9,

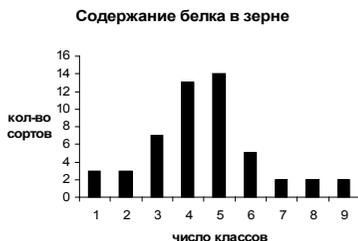
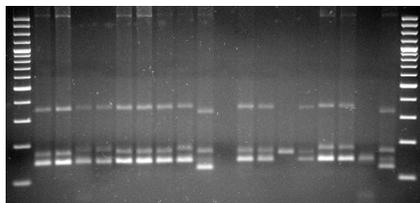
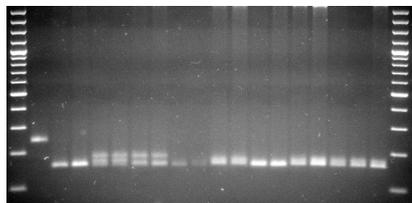


Рис. 1. Результаты распределения сортов озимой мягкой пшеницы по статистическим классам показателя СБЗ



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Рис. 2. Праймер *wmc* 415, 1, 20 — маркер 100 п.н. 2–3 — Астет, 4–5 — Шестопаливка, 6–7 — Переяславка 97, 8–9 — Белоцерковская полукарликовая, 10–11 — Юна, 12–13 — Ягрань 60, 14–15 — Цыганка, 16–17 — Зерноградка 11, 18–19 — Победа 50



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Рис. 3. Праймер *wmc* 41, 1, 20 — маркер 100 п.н., 2 — Безостая 1, 3–4 — Юна, 5–6 — Белоцерковская полукарликовая, 7–8 — Переяславка 97, 9–10 — Шестопаливка, 11–12 — Астет, 13–14 — Добирна, 15–16 — Дриада 1, 17–18 — Украинка одесская, 19 — Куяльник

которые обнаруживали при исследовании продуктов амплификации в агарозном геле. Из 8 аллелей *wmc* 415 четыре встречались крайне редко в данной популяции сортов: ≈ 125 п.н. (2 сорта); ≈ 140 п.н. (1 сорт); ≈ 168 п.н. (1 сорт) и ≈ 176 п.н. (1 сорт). Большинство сортов оказалось гомогенными по аллельному составу *wmc* 415, лишь сорта Белоцерковская полукарликовая, Цыганка, Победа 50, Скарбныця и Херсонская безостая обладали двумя биотипами. Из 9 аллелей *wmc* 41 крайне редко встречались 2 аллеля ≈ 176 п.н. (1 сорт) и ≈ 213 п.н. (1 сорт). Среди исследованных сортов имеющими биотипы по аллельному составу *wmc* 41 были Панна, Змина, Селянка, Мироновская 33, Ремеслизна и Свитанок 1.

На следующем этапе был проведен анализ частот идентифицированных аллелей по статистическим классам СБЗ. Среди аллелей маркера *wmc* 415, встречавшихся в исследованной сортовой популяции с наибольшей частотой ≈ 147 п.н.; ≈ 160 п.н.; ≈ 173 п.н. и ≈ 182 п.н., первые два были равномерно представлены по классам, тогда как для аллелей ≈ 173 п.н. и ≈ 182 п.н. наблюдалось неравномерное распределение (рис.4). Аллель ≈ 173 п.н. с большей частотой встречался в классах с более высоким СБЗ, тогда как аллель ≈ 182 п.н. — в классах с меньшим СБЗ. Среднее значение СБЗ сортов-носителей аллеля ≈ 173 п.н. составило 14,3%, тогда как у сортов-носителей аллеля ≈ 182 п.н. оно было 13,9% при среднем значении по всей исследованной выборке 14,13%. Разница между средними значениями для двух групп носителей маркерных аллелей была достоверной на уровне значимости 1%. Редко встречающиеся аллели ≈ 168 п.н. и ≈ 176 п.н. были характерны для пшениц класса 2 с относительно низким СБЗ, а аллели ≈ 125 п.н. и ≈ 140 п.н. в классах 5 и 6, т.е. с относительно средним СБЗ, но их низкая частота не позволяет сделать определенные выводы. При исследовании влияния аллелей *wmc* 41 оказалось, что аллели ≈ 161 п.н., ≈ 164 п.н., ≈ 170 п.н. и ≈ 188 п.н. равномерно распределялись по выделенным классам,

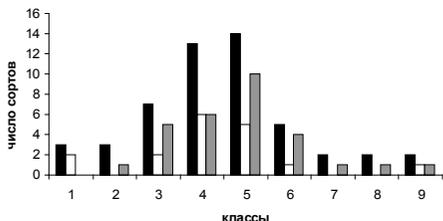


Рис. 4. Результаты распределения некоторых аллелей wmc 415 по классам СБЗ. Белые столбцы — аллель ≈182 п.н.; Серые столбцы — аллель ≈173 п.н.; Черные столбцы — общее число сортов в классах

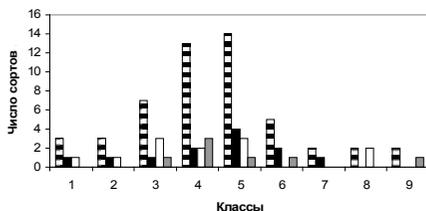


Рис. 5. Результаты распределения некоторых аллелей wmc 41 по классам СБЗ. Белые столбцы — аллель ≈181 п.н.; Серые столбцы — аллель ≈184 п.н.; Черные столбцы — ≈168 п.н.; Столбцы в полосу — общее число сортов в классах

тогда как редко встречающиеся аллели ≈213 п.н. и ≈176 п.н. встречались исключительно у сортов классов 1-го и 2-го. Поэтому основное внимание исследования было направлено на изучение влияния аллелей ≈168 п.н. ≈181 п.н. и ≈184 п.н. (рис. 5). Среднее значение СБЗ сортов-носителей аллеля ≈168 п.н. и сортов-носителей аллеля ≈181 п.н. составило 14,06%, тогда как у сортов-носителей аллеля ≈184 п.н. оно составило 14,3% при среднем значении по всей исследованной выборке 14,13%. Различия между средними значениями были на грани достоверности. Для исследования комплексного воздействия аллелей с положительным и отрицательным эффектом на признак СБЗ, нами были сформированы две выборки. Одна включала сорта-носители аллелей ≈168 п.н., ≈181 п.н. wmc 41 и ≈182 п.н. wmc 415, которые в нашем исследовании в основном идентифицировали в сортах с пониженным СБЗ, а другая включала сорта-носители аллелей ≈184 п.н. wmc 41 и ≈173 п.н. wmc 415 с позитивным эффектом на этот признак. Среднее значение СБЗ первой выборки составило 13,97%, а второй — 14,27%. Разница между средними значениями для двух групп носителей маркерных аллелей оказалась достоверной на уровне значимости 5%.

Сравнительный анализ полученных в этом исследовании результатов и результатов изучения РИЛ Индии [2-4], хотя и подтвердил возможность использования этих маркеров для прогнозирования СБЗ, показал и некоторые различия. В исследованиях Индийских ученых маркер wmc 41 определял 18,73% генетической изменчивости на популяции РИЛ. Если брать за основу разницу между СБЗ родительских форм, составляющую 5,1% СБЗ, в абсолютных единицах эта изменчивость соответствовала 0,96% СБЗ. Маркер wmc 415 определял 6,21% генетической изменчивости и 0,32% СБЗ в абсолютных единицах. Комбинацией обоих маркеров определялось до 25% генетической изменчивости и соответственно 1,28% СБЗ в абсолютных единицах. В проведенных нами исследованиях на популяции сортов возделываемых в Украине наиболее информативным оказался маркер wmc 415 для прогнозирования проявления признака СБЗ. Разница между двумя выборками, сформированными на основе определенных маркерных аллелей,

составила 0,4% СБЗ. При аналогичном исследовании маркера wmc41 этот показатель составил 0,24% СБЗ. Анализ комбинации аллелей с позитивным и негативным эффектом двух маркеров wmc 415 и wmc 41 не показал увеличения этого показателя, а наоборот — промежуточный результат между показателями маркеров wmc 415 и wmc 41 — 0,3% СБЗ.

Выводы

Проведенный анализ свидетельствует о том, что данные маркеры wmc 415 и wmc 41, в целом, возможно использовать для прогнозирования проявления признака СБЗ на сортах, культивирующихся в Украине. Были выделены аллели с позитивным и негативным эффектом на данный признак у каждого из маркеров. Диагностическими оказались аллели локусов хромосом 2D и 5A. Необходимо проведение дальнейших исследований по проверке эффективности уже идентифицированных на других популяциях маркеров СБЗ в применении к сортовому генофонду и природно-климатическим условиям Украины.

Литература

1. *Злацкая А.В.* Содержание белка в зерне пшеницы: генетика признака и некоторые прогнозы его улучшения у мягкой пшеницы // Генетика.— 2005.— 41, №8.— С. 1–13.
2. *Prasad M. et al.* A Microsatellite Marker Associated with a QTL for Grain Protein Content on Chromosome Arm 2DL of Bread Wheat // Theor. Appl. Genet.—1999.— V.99, №2.— P. 341–345.
3. *Prasad M. et al.* QTL analysis for grain protein content using SSR markers and validation studies using NILs in bread wheat // Theor. Appl. Genet.— 2003.— 106.— P. 659–667.
4. *Harjit-Singh et al.* STMS markers for grain protein content and their validation using near-isogenic lines in bread wheat // Plant Breeding.— 2001.— 120.— P. 273–278.
5. *Boisson M. et al.* Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet.— 2005.— 110, №5.— P. 932–940.
6. *Olmos S. et al.* Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat // Theor. Appl. Genet.— 2003.— 107.— P. 1243–1251.
7. *Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S.* A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome // Theor. and Appl. Genet.— 1993.— 86.— P. 705–712.
8. *Roder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al.* A microsatellite map of wheat // Genetics.— 1998.— 149.— P. 2007–2023.
9. *Лакун Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1980.— 296 с.

Резюме

Показана возможность использования микросателлитных маркеров wmc 415 и wmc 41 для прогнозирования признака СБЗ у озимой мягкой пшеницы Украины. Выделены аллели с позитивным и негативным эффектом локусов хромосом 2D и 5A.

Показано можливість використання мікросателітних маркерів wmc 415 і wmc 41 для прогнозування прояву ознаки ВБЗ у озимій м'якої пшениці України. Виділено алелі з позитивним і негативним ефектом локусів хромосом 2D і 5A.

The possibility of utilization of microsatellite markers wmc 415 and wmc 41 for prognosis of expression of GPC of common winter wheat it was shown. Alleles with positive and negative effects on GPG of loci of chromosomes 2D and 5A were selected.

ИШМУРАТОВА Н.М.¹, ЛОПАТИН А.В.², СОЛДАТОВА Н.В.³

¹Институт органической химии УНЦ РАН, insect@anrb.ru

²Воронежский государственный университет, lopatin_alex_v@yahoo.com

³ООО “Бамблби Компани”, г. Воронеж

АНАЛОГИ ФЕРОМОНОВ ПЧЕЛЫ В ИСКУССТВЕННЫХ КОЛОНИЯХ, СОСТОЯЩИХ ИЗ МАТКИ ШМЕЛЯ *BOMBUS TERRESTRIS* И РАБОЧИХ ОСОБЕЙ *APIS MELLIFERA*

Стимуляция развития колоний шмелей *Bombus terrestris* при помощи рабочих особей медоносной пчелы *Apis mellifera* — одна из распространенных методик, используемых при выращивании их в лабораторных условиях. Для этого, как правило, применяются недавно отродившиеся рабочие особи пчел (опушение которых еще не успело потемнеть), тогда как у зрелых особей ярко выражено оборонительное поведение: они часто травмируют и убивают маток шмелей [1].

Материалы и методы

Для создания лабораторных колоний нами применялись матки шмелей, прошедшие наркотизацию углекислым газом, которая стимулирует развитие зрелых ооцитов и откладку оплодотворенных яиц у 77–95% (в среднем 86%) маток шмеля. В цилиндрические садки диаметром 14 см с решетчатым дном и крышкой помещалась восковая вставка, матка шмеля и 3 рабочие особи пчелы. Колонии, достигшие численности не менее 7 рабочих шмелей, пересаживали в садки с дном размером 20×27 см². В качестве углеводного корма использовался 62%-ный сахарный сироп, белкового корма — пыльцевая паста из обножки медоносной пчелы и сахарного сиропа. В инсектариях для содержания шмелей поддерживалась температура 24–29 °С и влажность 46–70%. При еженедельном осмотре садков степень агрессивности пчел оценивали по степени поврежденности опушения маток шмелей: 0 — без значительных повреждений, 1 — мало повреждено (все перевязи брюшка частично или полностью сохранились), 2 — сильно повреждено (черная перевязь брюшка почти отсутствует, желтая и белая частично сохранились), 3 — опушение отсутствует на брюшке, а при высокой степени поврежденности и на большей части груди [2]. Спиртовые растворы феромонных композиций (ТОС-Ш-2, Кандисил), добавлялись в сахарный сироп для кормления шмелей, гелеобразные препараты (ТОС-Ш-1, Меллан) наносили на восковую вставку в центре садка либо на тело матки шмеля (табл. 1).

Результаты и обсуждение

В колониях, созданных из матки *B. terrestris* и недавно отродившихся (со светлым опушением) рабочих особей *A. mellifera*, продуктивность маток шмелей близка к максимальной. Воздействие феромонного препарата ТОС-Ш-1 привело к снижению изначально невысокой агрессивности молодых пчел, что ослабило их стимулирующее влияние на маток шмелей. В искусственных колониях из маток шмелей и зрелых рабочих особей пчелы агрессивные взаимодействия проявляются в значительно большей степени, чем