

УДК 575.113.1 : 577.22

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА S SR-МАРКЕРОВ,  
СЦЕПЛЕННЫХ С QTL-ЛОКУСАМИ УСТОЙЧИВОСТИ  
К ПРОРАСТАНИЮ НА КОРНЮ У ТРИТИКАЛЕ

Н.К. МАЙЕР<sup>2</sup>, П.Ю. КРУПИН<sup>1</sup>, В.В. ПЫЛЬНЕВ<sup>3</sup>,  
В.С. РУБЕЦ<sup>3</sup>, А.В. КОРШУНОВ<sup>2</sup>, М.Г. ДИВАШУК<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Центр молекулярной биотехнологии;<sup>2</sup> кафедра генетики и биотехнологии;  
<sup>3</sup> Кафедра селекции и семеноводства полевых культур  
РГАУ-МСХА имени КА. Тимирязева)

В коллекции из 48 озимой тритикале проведен анализ аллельного состояния микросателлитных локусов *Xwm104* *mXgwm155*, сцепленных с QTL-локусами устойчивости к прорастанию на корню. Впервые продемонстрирована взаимосвязь между аллельным состоянием молекулярного маркера *Xgwm155* и устойчивостью к прорастанию на корню у озимой тритикале.

**Ключевые слова:** тритикале, QTL, устойчивость к прорастанию на корню, селекция с использованием молекулярных маркеров (MAS), SSR-маркер.

Несмотря на все преимущества культуры тритикале, такие как неприхотливость к условиям выращивания, устойчивость ко многим болезням и высокая пищевая и диетическая ценность, у нее есть недостатки. Одним из них является подверженность тритикале прорастанию на корню. Единственное решение данной проблемы — создание устойчивых сортов. Разработка и использование молекулярных маркеров устойчивости к прорастанию на корню позволило бы значительно повысить эффективность селекционного процесса. Этот признак детерминирован наследственными и средовыми факторами, а также их сложным взаимодействием.

Для идентификации наследственных факторов устойчивости к прорастанию на корню необходимы надёжные методы оценки фенотипа. Число падения (ЧП) характеризуется сильной отрицательной корреляцией с признаком устойчивости к прорастанию на корню [1].

Некоторые исследователи отмечают, что у пшеницы покой может быть тесно связан с окраской зерновки. Однако прорастание на корню периодически происходит как у сортов с белым зерном, так и у краснозерных, показывая, что краснозерные генотипы не всегда гарантируют устойчивость [6]. Окраска зерновки является полимерным признаком, и интенсивность окрашивания зерна может варьироваться в зависимости от количества доминантных аллелей и степени влияния транскрипционных факторов [9].

Прорастание на корню у тритикале контролируется как отдельными генами [3], так и локусами количественных признаков (quantitative trait loci — QTL) [15].

Последние представляют собой участки хромосом, оказывающие существенное влияние на проявление количественного признака. Как правило, они представлены блоками генов, каждый из которых по отдельности слабо влияет на количественный признак. Среди молекулярных маркеров наилучшим образом для картирования QTL подходят микросателлитные маркеры, отличающиеся наиболее высокой степенью полиморфизма [10].

Так как геном тритикале представляет собой совокупность субгеномов ржи и пшеницы, то вопрос о проявлении генов и локусов количественных признаков, принадлежащих отдельным субгеномам в совокупном геноме, представляется крайне актуальным. В случае выявления сходной степени влияния локусов, выявленных у субгеномов, открываются широкие перспективы применения уже разработанных молекулярных маркеров непосредственно на тритикале с минимальными затратами труда и времени на их адаптацию для этой культуры [2]. В данной работе на коллекции из 48 образцов озимой гексаплоидной тритикале проведено изучение аллельного состояния двух микросателлитных маркеров: *Xwmc104*, локализованного на коротком плече хромосомы 6В и 1AS, [14] и *Xgwm155*, сцепленного с локусом *OPhs.CCSU-3A.1* на хромосоме 3AL. Данные маркеры сцеплены с устойчивостью к прорастанию на корню зерна у мягкой пшеницы [7, 8, 12, 13, 16]. Методами ассоциативной генетики проведен анализ связи аллельного состояния этих маркеров с устойчивостью на корню у тритикале.

### Материалы и методы

Исследование проводили на 48 линиях и сортах озимой тритикале различного географического происхождения (Россия, Польша, Беларусь, США, Румыния, Украина) (таблица). Все сорта были оценены по числу падения, которое определяли по стандартной методике на приборе 11411-3. Использовалось следующее деление на классы, принятое для ржи: <85 с — неустойчивые; 85-150 с — относительно устойчивые; 150-200 с — устойчивые; и более 200 с — суперустойчивые. Степень окраски зерна определяли по стандартной методике замачиванием в 5%-м растворе NaOH. ДНК выделяли из молодых листьев и корешков по методу [12]. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием праймеров на маркеры *Xgwm155* и *Xwmc104* [14], меченных FAM, синтезированные ЗАО «Синтол», Москва. Определение размеров амплифицируемых продуктов проводили на секвенаторе ABI-3130XL. Для определения тесноты связи признаков использовали коэффициент взаимной сопряженности Пирсона (P) [5].

### Результаты и их обсуждение

На основании показателя число падения (ЧП) все сорта классифицированы на четыре группы. К группе устойчивые отнесены шесть сортов (Виктор 15, 21759/97, Славянка, Никлап, Полесский 7, KS — 88Т), а суперустойчивые — только один (Ставропольский 2). В связи с малочисленностью этих двух групп при дальнейшей статистической обработке устойчивые и суперустойчивые сорта отнесли к группе устойчивых. В итоге к группе неустойчивые было отнесено 28 сортов, а устойчивые — 20 сортов тритикале (см. таблицу).

Устойчивость к прорастанию на корню у краснозерных форм пшеницы связана с наличием в зерновке флавоноидов, обеспечивающих красную окраску [13]. В связи с этим нами было выдвинуто предположение, что не только наличие флавоноидов, но

**Характеристика сортов тритикале по устойчивости к прорастанию на корню,  
аллельному состоянию микросателлитных локусов *Xwmc104* и *Xgwm155*  
и оттенку цвета зерна\***

Образцы, неустойчивые к ПК	<i>Xwmc104</i>	<i>Xgwm155</i>	Образцы, устойчивые к ПК	<i>Xwmc104</i>	<i>Xgwm155</i>
Союз*	a+e	b	Гренадер**	a	b
Хонгор*	a	d	Гермес**	e	d
Д-37*	a	a	Каприз**	c	e
Маара*	a	f	Корнет**	a	e
Тарасовский 1*	e	d	Е 775*	b	e+b
Marho*	c+a	e	АД 285*	d	d+f
Авангард*	d	b+e+d	Alamo*	a	b
Fidello*	d	b	№222*	b	e
Эллада*	a	e	Антей*	e	d
Presto*	a	b	Водолей*	c	b
Конвейер*	d+c	e	Кастусь*	d	e
Кентавр*	a	b	Виктор 15*	e	d
TF 30 TL1*	e	b	Ставропольский 2*	b	b
Модуль*	d+e	e	Линия 14**	a	b
Талисман*	d	e	Стрел ьна 11**	c	c
Дон*	c	c	Розовский 8**	a+c	c
Тальва 100**	a	d	АД 4996**	a	d
214406/96**	c	e	ТИ 17**	c	c
ПРАГ-Д 246/1**	a	e	АДМ 9**	d	f
Гармония**	e	a	KS-88Т**	a	d
Патриот**	d	e	21759/97**	c	c
Стрелец**	a	b	Славянка**	.	c
Амфидиплоид 45**	c	d	Никлап**	a	d
ПРАГ 488**	d	e	Полесский 7**	e	c

\* Сорта со светло-красным оттенком зерна, \*\* сорта с темно-красным оттенком зерна.

и их количество может оказывать влияние на устойчивость к прорастанию на корню у озимой тритикале. Все изученные образцы тритикале разделены по интенсивности окраски зерновки на две группы: светло-красные (устойчивые) и темно-красные (неустойчивые) (см. таблицу). В группе светло-красных оказалось 25 образцов озимой тритикале, в группе темно-красных — 23 образца тритикале. В данном случае изучаемый нами признак имеет, по сути, два альтернативных варианта, измеряемых по дихотомической шкале наименований, поэтому для статистического анализа взаимосвязи устойчивости к прорастанию на корню и интенсивности окраски мы использовали коэффициент взаимной сопряженности Пирсона (P) [5]. Так как при расчетах данные коэффициенты не превышали показателей 0,3 и 0,5 соответственно, то в этом случае связь между устойчивостью к прорастанию на корню и степенью окраски зерна отсутствует.

Анализ коллекции с использованием фрагментного анализа амплифицированных продуктов после проведения полимеразной цепной реакции выявил пять аллелей микросателлитного маркера *Xwmc104* — *a* (144 п.н.), *b* (138 п.н.), *c* (163 п.н.),

*d* (148 п.н.), *e* (150 п.н.). Кроме приведенных фрагментов практически на всех образцах озимой тритикале также интенсивно амплифицировался фрагмент размером 95 п.н. Однако фрагментный анализ не выявил характерной для SSR-маркеров «лестничной» структуры, что указывает на не микросателлитную природу фрагмента размером 95 п.н. В то же время разработчики данного маркера, а также ряд исследователей, изучавших в ПААГе ампликон данного размера, интерпретировали его как микросателлит, что, несомненно, могло внести ошибку в обработку полученных ими результатов в случае, например, минорной амплификации истинного микросателлитного локуса или наличия нуль-аллеля [16].

В целом наиболее распространенным оказался аллель *Xwmcl04a* — 38%. У пяти образцов озимой тритикале выявлено расщепление по данному микросателлитному локусу и они в дальнейших исследованиях не использовались. У одного сорта — Славянка — обнаружен нуль-аллель по данному локусу (см. таблицу).

При статистической обработке связи между аллельным состоянием данного маркера и признаком прорастания на корню никаких закономерностей ни в генеральной совокупности, ни в группах по цвету зерна выявлено не было. Обращает на себя внимание аллель *Xwmcl04b*, который амплифицируется только у трех образцов — Е775, № 222, Ставропольский 2, относящихся к устойчивым к прорастанию на корню и имеющим светло-красную окраску зерна. Таким образом, перспективные образцы Е775, № 222, Ставропольский 2 в дальнейшем могут быть использованы для исследований устойчивости к прорастанию на корню, а также в селекционных программах на данный признак, с использованием молекулярных маркеров.

Фрагментный анализ амплифицированных продуктов микросателлитного локуса *Xgwm / 55* среди всех образцов коллекции озимой тритикале выявил шесть аллелей — *a* (125 п.н.), *b* (127 п.н.), *c* (129 п.н.), *d* (140 п.н.), *e* (144 п.н.)/(148 п.н.) (см. таблицу). В отличие от маркера *Xwmcl04*, где преобладал один аллель — *Xwmcl04a*, у маркера *Xgwm155* три аллеля имели примерно одинаковое распространение среди изученных образцов озимой тритикале — *b, d, e*, — примерно по 27%. У трех образцов озимой тритикале выявлен полиморфизм по данному микросателлитному локусу, и они в дальнейших анализах не учитывались (см. таблицу). Связь между устойчивостью к прорастанию на корню и аллельным состоянием для всей коллекции была оценена статистически. Значение коэффициента взаимной сопряженности Пирсона (*P*) составило 0,43, что указывает на среднюю силу связи. Статистическую обработку мы также проводили отдельно для каждого из классов. Для образцов со светло-красным зерном коэффициент *P* составил 0,31; для образцов с темно-красным — 0,62. Таким образом, коэффициент связи для образцов со светло-красным зерном тритикале снижен по сравнению с общей коллекцией. Для образцов с темно-красным зерном показатель, наоборот, возрос, уверенно демонстрируя среднюю силу связи.

На основании этого можно считать, что существует тесная взаимосвязь между микросателлитным маркером *Xgwm155* и устойчивостью к прорастанию на корню у озимой тритикале. Также следует отметить, что если при расчетах не учитывать те аллели, по которым количество сортов было меньше трех, а также те, которые у образцов тритикале равномерно распределились среди устойчивых и неустойчивых, то взаимосвязь будет полной. Так, среди темно-краснозерных образцов при наличии аллеля *Xgwm155e* все образцы озимой тритикале были неустойчивы, а при наличии аллеля *Xgwm 155c* — все образцы были относительно устойчивы.

По отдельным типам аллелей, например *Xgwm 155c/*, наблюдалось равномерное распределение среди образцов как неустойчивых, так и относительно устойчивых. Следует помнить, что микросателлитный молекулярный маркер, входящий в QTL,

не является самим геном, а лишь сцеплен с ним. Поэтому гарантировать, что данный аллель будет нести устойчивость, а другой — нет, возможно лишь при условии тщательного изучения материала.

### Заключение

Микросателлитный локус *Xgwm155*, сцепленный с QTL устойчивости к прорастанию на корню у мягкой пшеницы, показал тесную взаимосвязь с устойчивостью к прорастанию на корню и среди темно-краснозерных образцов озимой тритикале. При этом наличие аллеля *Xgwm155c* ассоциировано с QTL, обеспечивающим относительную устойчивость образцов озимой тритикале, в противоположность аллелю *Xgwm 155e*, ассоциированного с отсутствием устойчивости к прорастанию на корню у озимой тритикале.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» ГК № 16.552.11.7032 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП «ВНИИСБ».

### Библиографический список

1. Данилкин Н.М., Соловьев А.А. Устойчивость линий и гибридов яровой тритикале к прорастанию зерна на корню // Известия ТСХА, 2008. Вып. 1. С. 81-85.
2. Крушин П.Ю., Дивашук М.Г., Хомякова О.В., Дьячук Т.П., Карлов Г.П. Молекулярно-цитогенетическая характеристика первичных тритикале, межамфилоидного гибрида и перспективных линий селекции НИИСХ Юго-Востока // Известия ТСХА, 2009. Вып. 3. С. 74-80.
3. Майер Н.К., Дивашук М.Г., Крушин П.Ю., Соловьев А.А. Влияние аллелей гена *Viviparous-1* на устойчивость к прорастанию на корню у яровой тритикале // Известия ТСХА, 2009. Вып. 4. С. 138-142.
4. Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences // Genetics, 1986. 112. P. 887-898.
5. Das D., Das A. Statistics in Biology & Psychology // Academic Publishers, Kolkata, 2008. P 187-193.
6. Finkelstein R., Reeves W, Ariizum T., Steber C. Molecular aspects of seed dormancy // Annu. Rev. Plant Biol., 2008. 5 (9). P. 387-415.
7. Garg T., Singh K., Ahuja M., Sidhu J.S., Dhaliwal H.S., Chhuneja P. Validation of the molecular markers linked to a major pre-harvest sprouting tolerance QTL mapped on wheat chromosome 3A // Indian J. Crop Science, 2007. 2(1). P. 223-225.
8. Gupta R.K., Balvan H.S., Kumar J., Mohan A., Kumar A., Mir R.R., Kumar S., Kumar R., Jaiswal V, Tyagi S., Agarwal P., Gahlaut V, Das M, Banerjee S. Deployment of molecular markers for the improvement of some important quality traits in bread wheat // 60 Annual Wheat News letter, 2010. 56. P. 60-64.
9. Himi I., Noda K. Red grain color gene (R) of wheat is a Myb-type transcription factor // Euphytica, 2005. 143. P. 239-242.
10. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>
11. Kong J., Wang F., Si J., Feng B., Li S. Water-soluble phenolic compounds in the coat control germination and peroxidase reactivation in *Triticum aestivum* seeds // Plant Growth Regulation, 2008. 56. P. 275-283.
12. Kulwal P.L., Kumar N., Gaur A., Khurana P., Khurana J.P., Tyagi A.K, Balvan H.S., Gupta P.K. Mapping of a major QTL for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 3A in bread wheat // TheorAppl Genet., 2005. 111(6). P. 1052-1059.
13. Mohan A., Kulwal P., Singh R., Kumar V, Mir R.R., Kumar J., Prasad M., Balvan H.S., Gupta P.K. Genome-wide QTL analysis for pre-harvest sprouting tolerance in bread wheat // Euphytica, 2009. 168 (3). P. 319-329.

14. Roy J.K., Prasad M., Varslmev R.K., Balvan H.S., Blake T.K., Dhaliwal H.S., Singh H., Edwards K.J., Gupta R.K. Identification of a microsatellite on chromosomes 6B and a STS on 7D of bread wheat showing an association with preharvest sprouting tolerance // *Theoretical And Applied Genetics*, 1999. (1-2). P. 336-340.

15. Rvbka K. An approach to identification of rye chromosomes affecting the pre-harvest sprouting intritcale // *J. Appl. Genet.*, 2003. 44(4). P. 491-496.

16. Yang Y, Zhao X.-L., Zhang Y., Chen X.-M., He Z.-H., Yu Z., Xia L.-O. Evaluation and Validation of Four Molecular Markers Associated with Pre-Harvest Sprouting Tolerance in Chinese Wheats // *Acta Agronomica Sinica*, 2008. 34(1). P. 17-24.

*Рецензент* — д. б. н. А.А. Соловьев

#### SUMMARY

The analysis of the polymorphic microsatellite loci Xwmcl04 and Xgwml55 linked to the QTL of pre-harvest sprouting (PHS) resistance was performed using the collection of 48 lines of winter tritcale. For the first time, the association between the allelic state of SSR marker Xgwml55 and resistance to PHS has been shown for winter tritcale.

**Key words:** winter tritcale, QTL, pre-harvest sprouting resistance, marker-assisted selection, SSR-marker.

Майер Николай Константинович — асс. кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. (499) 976-08-94.

Крушин Павел Юрьевич — к. б. н. Тел. (499) 977-70-01.

Пыльнев Владимир Валентинович — д. б. н. Тел. (499) 976-12-72.

Рубец Валентина Сергеевна — к. б. н.

Коршунов Александр Владимирович — асп. каф. генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н. Тел. (499) 977-72-01.

Эл. почта: divashuk@gmail.com.