

МАРКЕРНЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ QTL ЯЧМЕНЯ С ПОМОЩЬЮ RAPD И ИЗОФЕРМЕНТОВ

Проведена идентификация молекулярных (RAPD и изоферменты) маркеров, выявляющих разницу между количественными показателями ряда агрономических признаков. Анализ количественных признаков (масса 1000 зерен, кустистость, озерненность, продуктивность, количество зерен с одного растения) осуществлялся в течение 1994 и 1995 контрастных по погодным условиям годов. Показаны молекулярные маркеры, выявляющие достоверное различие между аллелями. Достоверная положительная корреляция между уровнем проявления признаков одного года и, соответственно, разницей между аллелями конкретного маркера выявлена только в условиях одного года.

Введение. Маркирование локусов, контролирующих различия по количественным признакам, является одной из наиболее важных и сложных проблем теории и практики селекции растений. Использование маркеров значительно увеличивает эффективность менделевского подхода, позволяя выявить вклад отдельных хромосом и их участков без учета общего количества локусов, определяющих изменчивость признака [1, 2]

Для определения сцепления молекулярных маркеров с локусами количественных признаков (QTL) предложены модели Дженсена [3] и Симпсона [4], в которых оценка параметров рекомбинации локусов количественных признаков относительно двух молекулярных маркеров производится методом максимального правдоподобия.

Симпсон рассматривает самоопыляющуюся популяцию как модель для детекции сцепления между локусом количественного признака и локусами ПДРФ. Автор показал, что для определения значения маркера достаточно анализа нескольких самоопыленных линий. Дженсен использовал метод максимального правдоподобия для оценки частоты рекомбинации локусов QTL и маркерных локусов на дигаплоидных линиях.

В генетико-селекционных исследованиях широкое применение нашли два типа молекулярных маркеров — белки и ДНК. Белковые маркеры являются традиционными и относительно хорошо изученными.

Большой интерес представляет использование в качестве молекулярных маркеров продуктов амплификации ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Благодаря высокой производительности, позволяющей анализировать большое количество образцов, метод нашел широкое применение при решении ряда генетико-селекционных проблем [5, 6]. Использование ПЦР расширило возможности молекулярно-генетического анализа.

Целью нашей работы была идентификация молекулярных (RAPD и изоферментов) маркеров, выявляющих достоверную разницу количественного показателя между аллелями.

Материалы и методы. Материалом служили 150 линий ячменя самоопыляющейся популяции Одесский 115 х Гольф (F₇₋₈). Анализ количественных признаков проводился в течение 1994 и 1995 гг., контрастных по погодным условиям. 1994 г. был засушливым, а 1995 г. влажным и благоприятным для возделывания ячменя.

Исследовали следующие показатели: массу 1000 зерен, кустистость (отношение количества стеблей к числу растений), озерненность (отношение количества зерен с пяти растений к числу стеблей), продуктивность (отношение веса зерна к числу растений), количество зерен с одного растения.

В качестве маркеров использовали изоферменты с известной локализацией кодирующих их локусов: *Est 5*, расположенная в коротком плече

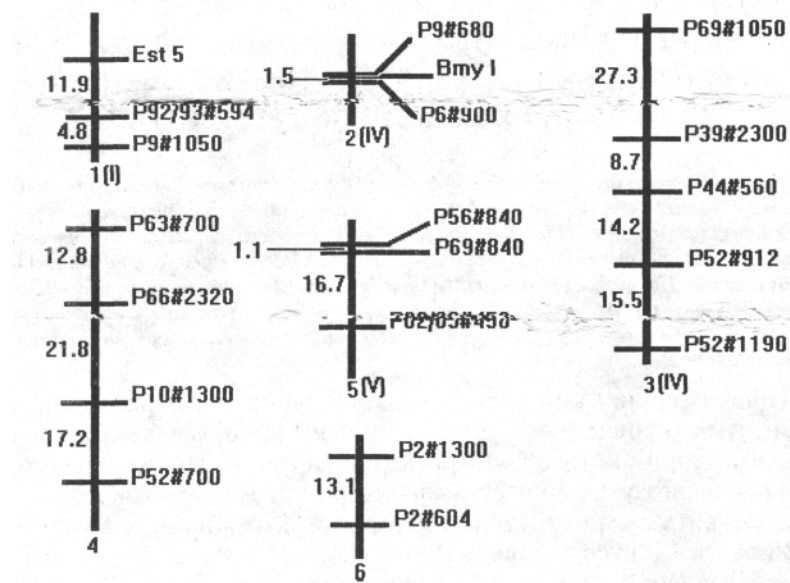


Рис.1. Шесть групп сцепления, полученные на данных самоопыляющейся популяции F₈ Одесский 115/Гольф. В скобках указаны номера хромосомы

хромосомы 1; *Est 1*, маркирующая длинное плечо хромосомы 3; *Amy 1* с локализацией в хромосоме 6; *Bmy 1*, маркирующая длинное плечо хромосомы 4. Анализировали локусы праймирования продуктов амплификации, с использованием праймеров P2, P6, P9, P10, P22, P39, P44, P52, P56, P63, P66, P69, P82, P83, P92 и P93 [7].

Выделение геномной ДНК и условия полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами, а также выделение и идентификация изоферментов: а- и b-амилаз и эстераз описаны ранее.

На основании известных формул и моделей создала компьютерная программа "MAP QTL" для Ms-DOS и её 32-битная версия "WMAP QTL" для Windows 95/NT (Календарь Р.Н., неопубликованные данные). Программа позволяет определить сцепление молекулярного маркера с локусом, определяющим различия количественного признака.

Результаты исследований и их обсуждение. Используемые маркеры охватывали шестую часть (237 сМ) генома ячменя (рис.1) Условия выращивания оказали влияние на величину коэффициентов корреляции между показателями количественных признаков (табл.1). В 1994 г. уровень проявления изучаемых агрономических признаков был низким. В разные годы не обнаружено значительной корреляции между показателями одних и тех же количественных признаков.

Достоверная положительная корреляция отмечена между уровнем проявления признаков одного года. Так, в 1994 г. положительно коррелировали продуктивность— озерненность— количество зерен с одного растения, а в 1995 — кустистость— продуктивность— количество зерен с одного растения— озерненность. Не обнаружено достоверной корреляции массы 1000 зерен с иными агрономическими признаками.

Достоверная разница между аллелями конкретного маркера выявлена только в условиях одного года. В табл. 2 приведены достоверно проявившиеся маркеры изучаемых количественных признаков.

По данным 1994 г. выявлена связь между признаком «продуктивность» и продуктом амплификации P52#700 из четвертой группы сцепления и P57#1000. В 1995 г. этот признак маркировался P69#1050 и P39#2300 из третьей группы сцепления. Максимальное среднее значение

«продуктивности» наблюдалось у линий с генотипом «11» с аллелями присутствия обоих продуктов амплификации (Р69#1050 и Р39#2300).

Наименьшее среднее значение «продуктивности» было у генотипов «00», характеризующихся отсутствием вышеуказанных аллелей. У промежуточных «10» и «01» рекомбинантных генотипов значение продуктивности было ниже максимального. Вероятно, локус, определяющий различия изучаемого количественного признака, расположен ближе к маркеру Р69# 1050, чем к Р39#2300 (рис.1,а).

«Озерненность» идентифицируется в 1994 г. маркерами различных групп сцепления: второй — Р6#800, Р9#680, Вму 1, третьей — Р69#1050, четвертой — Р63#700, Р66#2320, шестой — Р2#604 и продуктом амплификации Р57#1000, не отнесенным к этим группам сцепления. Наибольшая величина показателя соответствовала маркерам второй группы сцепления: более подвижным аллелем Вму 1Аг [8], отсутствию продукта амплификации Р6#900 и наличию Р9#680. В четвертой группе сцепления этот показатель преобладал у генотипов «01» с отсутствием продукта амплификации Р66#2320 и наличием Р63#700. Для линий типа «01» среднее значение показателя озерненности составило 12.01, для «11» типа — 10.67, для «10» — 10.31, а для «00» — 10.14. Достоверное различие между значениями озерненности у генотипов с показателем «01» и «10» составило 1.7. Генотипы «10» и «01» соответствуют родителям, а «11» и «01» представляют рекомбинантные формы.

В 1995 г. достоверное проявление показателя озерненности связано с маркерами Р52#700 (четвертая группа) и Р44#560 (третья группа). Максимальное значение отмечено у линий с генотипом «наличие» продукта Р52#700 и «отсутствием» Р44#560.

«Количество зерен на одном растении» в 1994 г. определяется маркерами нескольких групп сцепления: третьей — Р44#560, четвертой —

Т а б л и ц а 1

Коэффициенты корреляции между количественными показателями за два года

Показатели	Кустистость 1994 г.	Продук- тив- ность 1995 г.	Продук- тивность 1994 г.	Масса 1000 зерен 1995 г.	Масса 1000 зерен 1994 г.	Озер- нен- ность 1995 г.	Озер- нен- ность 1994 г.	Коли- чество зерен на одном растении 1995 г.	Коли- чество зерен на одном растении 1994 г.
Кустистость									
1995 г.	0.09	0.57	-0.13	0.12	0.02	-0.22	-0.11	0.61	-0.16
1994 г.		0.14	0.35	0.22	0.05	0.07	-0.02	0.13	0.4
Продуктивность									
1995 г.			0.04	0.37	-0.07	0.53	-0.07	0.94	0.07
1994 г.				0.01	0.07	0.25	0.65	0.08	0.97
Масса 1000 зерен									
1995 г.					0.17	0.04	-0.02	0.15	0.07
1994 г.						-0.16	-0.07	-0.04	-0.1
Озерненность									
1995 г.							-0.01	0.59	0.26
1994 г.								-0.12	0.70
Количество зерен на одном растении									
1995 г.									0.08

Таблица 2

Результаты статистического анализа популяции №106 (F_{7,8}, Одесский 115/ Гольф) за 1994 и 1995 гг.

Количественный показатель	Маркер	Средняя величина для аллеля	Количество особей	Оценка разности средних
Продуктивность	P39#2300 (1995 г.)	0 9.24 ± 0.21 1 9.93 ± 0.28	70 62	t = 2.803**
	P52#700 (1994 г.)	0 3.47 ± 0.13 1 3.96 ± 0.19	40 40	t = 2.057*
	P57#1000 (1994 г.)	0 3.42 ± 0.16 1 4.07 ± 0.15	42 47	t = 2.956***
	P69#1050 (1995г.)	0 9.19 ± 0.24 1 9.98 ± 0.27	61 64	t = 2.188
Озерненность	BmyI (1994г.)	Ar 11.56 ± 0.44 Bg 10.17 ± 0.39	61 49	t = 2.305*
	P6#900 (1994 г.)	0 11.56 ± 0.44 1 10.17 ± 0.39	61 49	t = 2.305*
	P9#680 (1994 г.)	0 11.64 ± 0.44 1 10.39 ± 0.39	65 52	t = 2.066*
	P2#604 (1994г.)	0 11.85 ± 0.47 1 10.24 ± 0.38	50 56	t = 2.113*
	P69#1050 (1994 г.)	0 11.77 ± 0.52 1 10.43 ± 0.38	60 52	t = 2.598**
	P52#700 (1995 г.)	0 17.79 ± 0.13 1 18.94 ± 0.35	57 71	t = 2.057*
	P44#560 (1995 г.)	0 18.79 ± 0.33 1 17.56 ± 0.38	72 70	t = 2.43**
	P66#2320 (1994 г.)	0 11.84 ± 0.43 1 10.37 ± 0.41	57 60	t = 2.473**
	P63#700 (1994г.)	0 10.23 ± 0.43 1 11.70 ± 0.41	49 68	t = 2.455**
	P57#1000 (1994 г.)	0 10.46 ± 0.43 1 11.82 ± 0.45	54 56	t = 2.173
	P2#604 (1994г.)	0 95.90 ± 4.02 1 81.33 ± 4.33	62 54	t = 2.465**
Количество зерен на одном растении	P69#1050 (1995 г.)	0 224.2 ± 5.32 1 243.9 ± 6.65	65 66	t = 2.317 **
	P39#2300 (1995 г.)	0 223.6 ± 5.05 1 246.3 ± 6.51	76 62	t = 2.803**
	P57#1000 (1994 г.)	0 80.11 ± 3.76 1 96.90 ± 4.44	54 60	t = 2.852**
	P66#2320 (1994 г.)	0 94.06 ± 4.06 1 81.81 ± 4.21	61 59	t = 2.096*
	P44#560(1995 г.)	0 241.31 ± 6.01 1 221.21 ± 5.56	72 70	t = 2.449 **
	P39#1188 (1995 г.)	0 39.37 ± 0.37 1 40.60 ± 0.31	60 62	t = 2.567**
Масса 1000 зерен	P2#1300 (1995 г.)	0 40.74 ± 0.45 1 39.33 ± 0.27	46 63	t = 2.407**
	P2#604 (1995 г.)	0 40.54 ± 0.33 1 39.47 ± 0.27	72 68	t = 2.497**
	P57#1000(1995 г.)	0 40.55 ± 0.32 1 39.49 ± 0.29	64 73	t = 2.437*
	P63#700 (1994 г.)	0 7.36 ± 0.27 1 8.07 ± 0.23	60 80	t = 2.044*
Кустистость	P66#2320(1994 г.)	0 8.21 ± 0.24 1 7.38 ± 0.25	66 74	t = 2.405*

Примечание. P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; «0» — отсутствие продукта амплификации; «1» — наличие продукта амплификации.

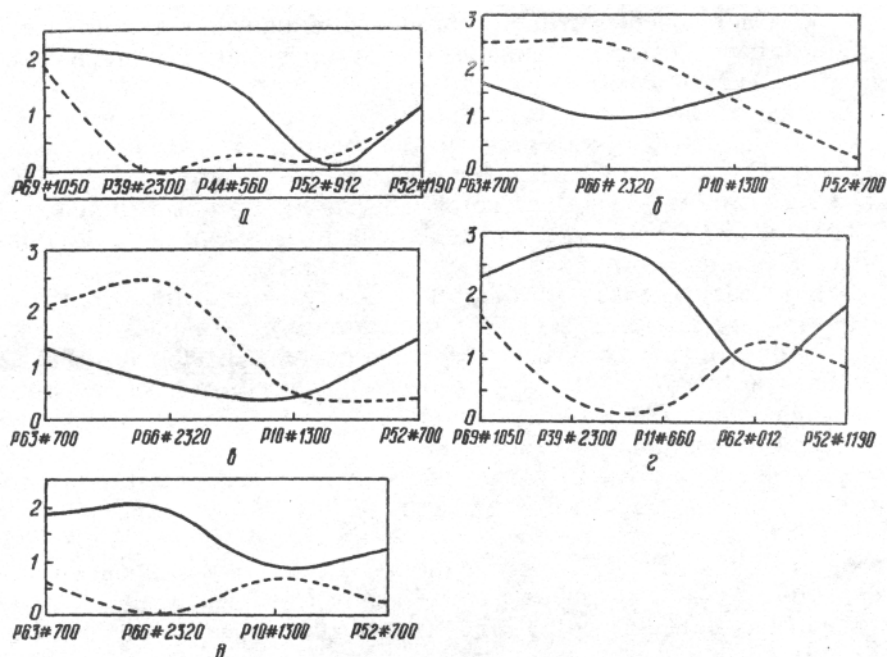


Рис. 2. Проявление количественного признака в третьей и четвертой группах сцеплений в 1994 г. (штриховая линия) и 1995 г. (сплошная линия): а — продуктивность; б — озерненность; в — кустистость; г — число зерен на 1 растении; д — масса 1000 зерен; по вертикали — Т-критерий; а, г — 3-я группа сцепления; б, в, д — 4-я группа сцепления

Р66#2320, шестой — Р2#604 и продуктом Р57#1000. В 1995 г. этот признак связан с маркерами третьей группы — Р69#1050, Р39#2300. Наибольшее значение признака определено у линий с генотипом «наличия» продуктов Р69#1050 и Р39#2300 («11»), У растений типа «11» среднее количество зерен на одном растении составило 255.66, а у типа «00» — 223.48. Достоверность разницы между средними значениями признака у этих генотипов составила $P < 0.01$ при $t = 2.773$.

Признак «масса 1000 зерен» маркировался только в 1995 г. продуктами амплификации шестой группы сцепления Р2#1300 и Р2#604 и не сцепленными маркерами Р57#1000 и Р39#1187.

Признак «кустистость» только в 1994 г. показал сцепление с маркерами Р66#2320 и Р63#700 четвертой группы сцепления. Наибольшее значение показателя кустистости 8.21 определено у генотипов «01» (отсутствие Р66#2320, наличие Р63#700). Растения альтернативного «10» генотипа имели наименьшее значение признака — 7.22. Достоверность разницы средних между этими генотипами оказалась $P < 0.01$ при $t = 2.658$. Рекомбинантные генотипы «11» и «00» показали промежуточные значения признака — соответственно 7.62 и 8.16, родительские генотипы — «10» и «01».

Достоверные в условиях 1994 г. результаты маркирования ряда количественных признаков не воспроизводились в 1995 г. Различия между аллелями маркера, обнаруженные в 1994 г., не проявились в 1995 г.

Наибольшая достоверная разница величины количественного признака наблюдалась между аллелями маркера у линий, содержащих генотип родительских форм. Наибольшая разница признака продуктивность отмечена для линий с продуктом амплификации Р69#1050 и Р39#200 — «11» Одесского 115 и «00» Гольфа. Такая же картина выявлена для показателей «озерненность» и «кустистость». Линии, содержащие родительские генотипы продуктов амплификации Р66#2320 и Р63#700 «10» Гольфа и «01» Одесского 115, имели наибольшие показатели признака.

Открывается перспектива отбора рекомбинантных линий, несущих «лучшие» пары аллелей сцепленных маркеров, которые получены от Одесского 115 и Гольфа.

В 1994 г. линии, содержащие «01» генотип Одесского 115 для Р66#2320 и Р63#700 (четвертая группа сцепления), показали высокое значение «кустистости» и «количества зерен на растении». В 1995 г. линии с генотипом «11» Одесского 115 для продуктов амплификации Р69#1050 и Р39#2300 (третья группа сцепления) имели высокие показатели «озерненности» и «количества зерен на растении».

Для засушливых зон можно рекомендовать генотипы, содержащие продукты амплификации Р63#700 (кустистость), Р57#1000 (продуктивность, озерненность, количество зерен на растении), Р9#680 и Р66#2320 (озерненность), Р52#700 (продуктивность), а также «отсутствие» продукта амплификации Р6#900 (озерненность), Р2#604 (озерненность, количество зерен на растении, кустистость).

В зонах с достаточным увлажнением будут более продуктивными генотипы с продуктами амплификации Р39#1188 (масса 1000 зерен), Р39#2300 (количество зерен на растении, продуктивность), Р69#1050 (продуктивность), Р52#700 (озерненность) и сопутствием продуктов амплификации Р44#560 (озерненность, количество зерен на растении), Р2#1300 (масса 1000 зерен), Р2#604 (масса 1000 зерен), Р57#1000 (масса 1000 зерен).

Для выделения маркеров полигенных признаков, эффективных для генотипа в различных зонах выращивания, необходимо проводить анализ растений одной комбинации в разных эколого-географических зонах, как осуществляют участники североамериканского проекта по картированию генома ячменя.

Авторы выражают признательность А.Ф.Стедьмаху за ценные замечания при подготовке рукописи.

Эта работа частично поддержана Международной Соросовской программой по поддержке образования в областях точных наук (ISSEP), грант № PSU054057.

SUMMARY. Molecular (RAPD and isoenzymes) markers, that revealed differences between quantitative indices of some agronomical traits were identified. Analysis of quantitative traits (mass of 1000 grains, shoot number per plant, kernel number per spike, productivity and grain number per plant) was carried out during 1995-1996 under contrast climate conditions. Molecular markers, that revealed significant distinctions between alleles were found. Significant positive correlation between the level of traits expression for one year and differences between alleles of one marker were found only under one year condition.

РЕЗЮМЕ. Проведена ідентифікація молекулярних (RAPD і ізоферменти) маркерів, що виявляють різницю між кількісними показниками ряду агрономічних ознак. Аналіз кількісних ознак (маса 1000 зерен, кущистість, озерненість, продуктивність, кількість зерен з однієї рослини) здійснювався на протязі 1995 і 1996 контрастних з погодними умовами років. Показано молекулярні маркери, що виявляють достовірну різницю між алелями. Достовірною позитивною кореляцією відмічена між рівнем прояви ознаки одного року і, відповідно, різниця між алелями конкретного маркера знайдена тільки в умовах одного року.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Серебровский А.С. Генетический анализ. - М.: Наука, 1970. 242 с.
2. Soller M., Beckmann J. S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement // Theor. Appl. Genet. - 1983. - 67. - P. 25-33.
3. Jensen J. Estimation of recombination parameters between a quantitative trait locus (QTL) and two marker gene loci // Theor. Appl. Genet. — 1989. — 78. — P. 613-618.
4. Simpson S. P. Detection of linkage between quantitative trait loci and restriction fragment length polymorphisms using inbred lines // Theor. Appl. Genet. — 1989. — 77. — P. 815-819.