ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 2, с. 179–184

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575.116:633.16

# АНАЛИЗ СЦЕПЛЕНИЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ КАЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ НА ХРОМОСОМЕ 6

**© 2021 г. В. П. Нецветаев***

*Белгородский федеральный аграрный научный центр Российской академии наук, Белгород, 308001 Россия*

**e-mail: v.netsvetaev@yandex.ru*

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.
После доработки 06.04.2020 г.
Принята к публикации 08.07.2020 г.

На основе генетического анализа $F_2$ по $F_3$ комбинации M13 × r “e’’+o проведена оценка частот рекомбинации между генетическими факторами хромосомы 6 (=6H) у ячменя. Исследование включало следующие гены: *r“e’’* (гладкие ости “e’’), *sex 1* (щуплый эндосперм, ксения 1), *o* (оранжевая окраска цветковой чешуи), *gs 4* (отсутствие воскового налета на колосе 4), *Amy 1–7* (α-амилаза 1, тип 7). Локус *Amy 1* идентифицировали путем разделения альфа-амилазы с помощью электрофореза при pH 8.3. На основе пятиточечного теста установлен следующий порядок расположения изученных локусов в хромосоме 6 (=6H): **6S**–*r“e”* (*=raw 5*) – *gs 4* (*=gsh 4*) – *o* (*=rob 1*) – **cen**– *Sex 1* –*Amy 1* – **6L.** Оценка сцепления и анализ данных литературы свидетельствуют, что среди указанных генов локусы *Sex 1* и *Amy 1* находятся в длинном плече хромосомы 6, остальные генетические факторы ассоциированы с коротким плечом этой хромосомы. Центромера находится между генетическими факторами *Sex 1* и *o* (*=rob 1*). В целом представленные данные свидетельствуют о необходимости корректировки генетической карты сцепления хромосомы 6 (= 6H) ячменя.

*Ключевые слова:* ячмень, рекомбинация, гены, карта сцепления, изоферменты альфа-амилаза, хромосома 6 (= 6H).

**DOI:** 10.31857/S0016675821020077

Альфа-амилаза (К.Ф. 3.2.1.1) зерновых обнаруживается в прорастающих семенах ячменя [1–3]. Следует отметить, что зрелые и прорастающие зерна обладают также бета-амилазной активностью (К.Ф. 3.2.1.2). Есть несколько физико-химических способов, позволяющих отличить α- и β-амилазы. Так, в присутствии мочевины происходит инактивация β-амилазы при сохранении α-амилазной активности [3], что позволяет провести генетический анализ изоферментного состава α-амилазы. Для выявления вариантов альфа-амилазы ячменя используется изоэлектрофокусирование [4] или обычный электрофорез при pH 8.3 [5]. Изоферменты альфа-амилаз у ячменя контролируются двумя локусами *Amy 1* и *Amy 2.* На основе анализа пшенично-ячменных дополненных линий установлено, что локус *Amy1* находится в хромосоме 6 (=6H), а фактор *Amy 2* в хромосоме – 1 (=7H) ячменя [4]. Анализ сцепления с маркерными генами хромосомы 1 (=7H) показал, что локус *Amy 2* расположен в длинном плече хромосомы 1 на расстоянии 19.91 ± 3.55% рекомбинации от гена *n* (*=nud1*), обусловливающего голозерность зерна [6]. По данным G. Nielsen и O. Frydenberg [7] *Amy 1* ориентирован в длинном плече хромосомы 6 в следующем порядке, относительно двух известных генов*: o* – $x_n$ – *Amy 1.* В сводной карте сцепления хромосомы 6 локус *Amy 1* находится в длинном плече хромосомы 6 дистально по отношению к гену $x_n$ [8, 9].

Наши данные показали некорректность расположения локуса *Amy 1* и известных генов на сводной карте сцепления хромосомы 6. В связи с этим приводим полученные нами результаты по корректировке места положения ряда известных генов, контролирующих морфологические признаки растений ячменя и локуса *Amy 1*, на карте сцепления хромосомы 6.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для картирования и локализации генов, ответственных за синтез этого фермента, исследовали гибридную комбинацию от скрещивания образцов ячменя, несущих маркерные гены, охватывающие хромосому 6 и отличающиеся по изоэнзимам α-амилаз. В комбинации скрещивания один родитель – Risø M13 (=RisØ 13) – являлся носителем следующих аллелей: *R“e”* (Зазубренные ости “e”), *sex 1* (*=lys 5*) (щуплый эндосперм, ксения 1), *O* (Соломенная окраска цветковой чешуи), *Gs 4* (Наличие воскового налета на колосе 4),

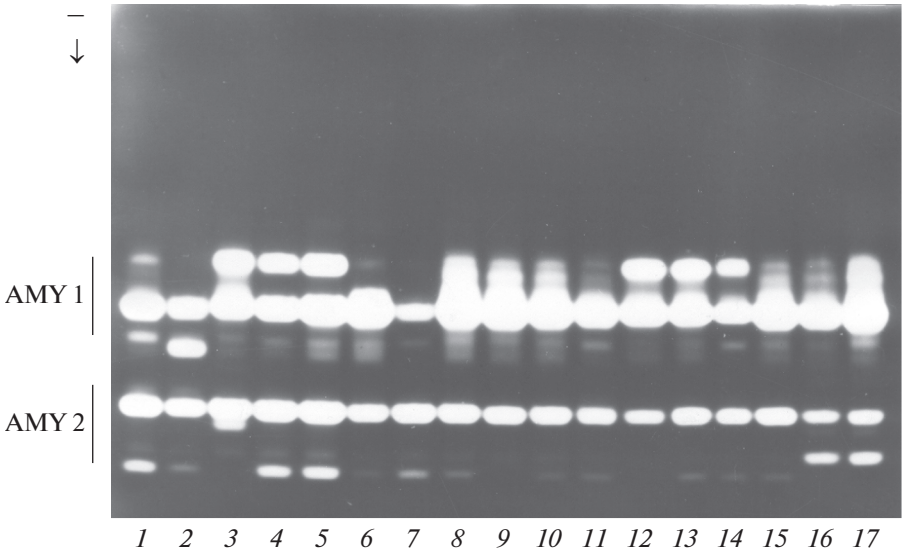


**Рис. 1.** Зимограммы α-амилаз отдельных зерен различных сортов ячменя: *1* – DoubletXXXHORDq; *2*, *3* – Треби (к-11835); *4*, *5* – Харьковский 74; *6*, *7* – Уссурийский 8 (к-18334); *8*, *9* – Круглик 21 (к-13031); *10*, *11* – Носовский 9; *12*, *13* – Носовский 6 (к-19828); *14*, *15* – Носовский 2 (к-19016); *16*, *17* – Одесский 36.

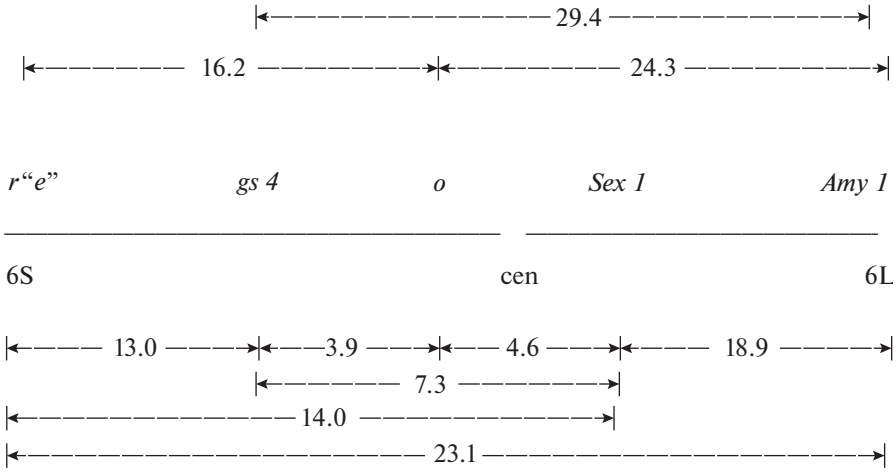


**Рис. 2.** Карта сцепления пяти локусов хромосомы 6 (=6H) ячменя.

*V* (Двурядный колос), *Amy 1–6* (α-амилаза 1 тип 6). Другой родитель r "e" + o нес, соответственно, следующие альтернативные генетические факторы: *r* "*e*" (гладкие ости "e"), *Sex 1* (Выполненный эндосперм), *o* (оранжевая окраска цветковой чешуи), *gs 4* (отсутствие воскового налета на колосе 4), *v* (шестирядный колос), *Amy 1–7* (α-амилаза 1 тип 7). По α-амилазе 2 родители не различались и несли вариант AMY 2–1 (рис. 1). Гены *r* "*e*", *o*, *gs 4*, *sex 1* расположены в хромосоме 6, а – *v* находится в хромосоме 2 [8, 9].

Учитывая рекомендуемые изменения в символике обозначения используемых генов [10], в скобках привожу рекомендуемые их символы: *r "e"* (=*raw 5*) – гладкие ости 5, *o* (=*rob 1*) – оранжевая лемма 1, *sex 1* – щуплый эндосперм, ксения 1, *gs 4* (=*gsh 4*) – глянцевый 4. Наиболее распространенные старые названия генов приведены в табл. 1 и на рис. 2.

Зерно, предназначенное для электрофоретического анализа α-амилазы, проращивали в темноте при 20°C в течение 5–7 суток. Для экстракции фермента проросшую зерновку освобождали от пленок, помещали в толстостенную стеклянную пробирку, заливали раствором 0.2%-ного хлористого кальция с 20%-ной сахарозой и 0.03%-ного бромфенолового синего. После измельчения эндосперма палочкой из стекла или нержавеющей стали, суспензию настаивали 1 ч при комнатной температуре. После центрифугирования надосадочную

**Таблица 1.** Оценка сцепления *Amy 1* с генетическими факторами хромосомы 6 (=6H) (данные $F_2$ по $F_3$ M13 × × r “e” + o)

| Аллели | Фенотипы в $F_2$ ($F_2$ по $F_3$) | | | | $\chi^2_L$ | Рекомбинация, % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $\frac{A}{a} \times \frac{B}{b}$ | | BB | Bb | bb | | |
| $\frac{R\text{“}e\text{”}}{r\text{“}e\text{”}} \times \frac{O}{o}$ | AA<br>Aa<br>aa | 21<br>5<br>0 | 8<br>36<br>1 | 1<br>7<br>0 | 55.52 | 16.23 ± 3.30 |
| $\frac{R\text{“}e\text{”}}{r\text{“}e\text{”}} \times \frac{Gs\ 4}{gs\ 4}$ | AA<br>Aa<br>aa | 24<br>6<br>0 | 6<br>36<br>1 | 0<br>6<br>0 | 74.28 | 13.01 ± 2.90 |
| $\frac{R\text{“}e\text{”}}{r\text{“}e\text{”}} \times \frac{V}{v}$ | AA<br>Aa<br>aa | 6<br>14<br>0 | 14<br>29<br>1 | 10<br>5<br>0 | 2.59 | Независимая |
| $\frac{R\text{“}e\text{”}}{r\text{“}e\text{”}} \times \frac{Sex\ 1}{sex\ 1}$ | AA<br>Aa<br>aa | 0<br>7<br>0 | 10<br>39<br>1 | 20<br>2<br>0 | 58.39 | 14.03 ± 3.01 |
| $\frac{O}{o} \times \frac{Gs\ 4}{gs\ 4}$ | AA<br>Aa<br>aa | 26<br>4<br>0 | 0<br>41<br>2 | 0<br>0<br>6 | 127.40 | 3.88 ± 1.57 |
| $\frac{O}{o} \times \frac{V}{v}$ | AA<br>Aa<br>aa | 6<br>9<br>5 | 15<br>27<br>2 | 5<br>9<br>1 | 1.02 | Независимая |
| $\frac{O}{o} \times \frac{Sex\ 1}{sex\ 1}$ | AA<br>Aa<br>aa | 0<br>0<br>7 | 5<br>44<br>1 | 21<br>1<br>0 | 99.98 | 4.59 ± 1.68 |
| $\frac{Gs\ 4}{gs\ 4} \times \frac{Sex\ 1}{sex\ 1}$ | AA<br>Aa<br>aa | 0<br>1<br>6 | 9<br>41<br>0 | 21<br>1<br>0 | 90.10 | 7.33 ± 2.13 |
| $\frac{Gs\ 4}{gs\ 4} \times \frac{V}{v}$ | AA<br>Aa<br>aa | 7<br>9<br>4 | 16<br>26<br>2 | 7<br>8<br>0 | 1.68 | Независимая |
| $\frac{V}{v} \times \frac{Sex\ 1}{sex\ 1}$ | AA<br>Aa<br>aa | 4<br>2<br>1 | 12<br>29<br>9 | 4<br>13<br>5 | 2.77 | Независимая |
| $\frac{R\text{“}e\text{”}}{r\text{“}e\text{”}} \times \frac{Amy\ 1\text{–}7}{Amy\ 1\text{–}6}$ | AA<br>Aa<br>aa | 15<br>44<br>1 | | 15<br>4<br>0 | 23.81 | 23.08 ± 5.31 |
| $\frac{O}{o} \times \frac{Amy\ 1\text{–}7}{Amy\ 1\text{–}6}$ | AA<br>Aa<br>aa | 13<br>39<br>8 | | 13<br>6<br>0 | 16.17 | 24.26 ± 5.40 |
| $\frac{Sex\ 1}{sex\ 1} \times \frac{Amy\ 1\text{–}7}{Amy\ 1\text{–}6}$ | AA<br>Aa<br>aa | 7<br>44<br>9 | | 0<br>6<br>13 | 19.69 | 18.90 ± 4.89 |
| $\frac{Gs\ 4}{gs\ 4} \times \frac{Amy\ 1\text{–}7}{Amy\ 1\text{–}6}$ | AA<br>Aa<br>aa | 17<br>37<br>6 | | 13<br>6<br>0 | 11.79 | 29.37 ± 5.98 |
| $\frac{V}{v} \times \frac{Amy\ 1\text{–}7}{Amy\ 1\text{–}6}$ | AA<br>Aa<br>aa | 14<br>35<br>11 | | 6<br>9<br>4 | 0.11 | Независимая |

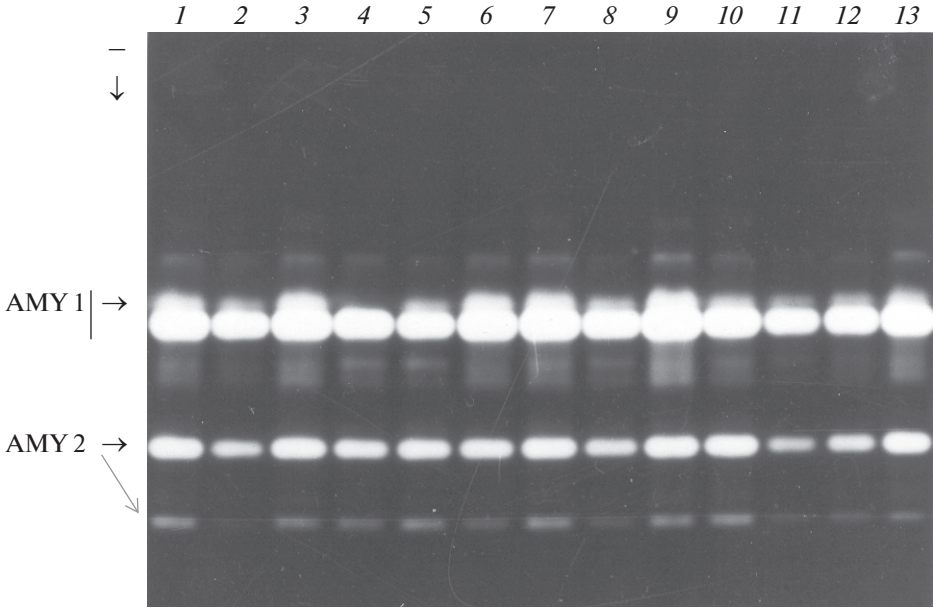


**Рис. 3.** Зимограммы α-амилаз зерна гибридов $F_2$M13 × r “e” + o. M13 имеет зимограмму, подобную представленной на дорожке *4* (AMY 1–6), второй родитель – как на дорожке *3* (AMY 1–7). Стрелкой отмечен изоэнзим AMY 1, по которому наблюдалось различие.

жидкость использовали для электрофореза. Электрофоретическое разделение α-амилаз и выявление его изоферментного состава проводили по прописи В.П. Нецветаева [5]. С целью инактивации β-амилазы в гель вводили 5 М мочевины.

Для оценки сцепления использовали $\chi^2$-тест [11]. Величину рекомбинацию определяли методом максимального правдоподобия [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типы изоферментов амилаз, контролируемых локусами *Amy 1* и *Amy 2* иллюстрирует рис. 1. Здесь приведены зимограммы этого энзима некоторых сортов ячменя. Как видно, зона изоферментов с медленной подвижностью контролируется локусом *Amy 1*, а синтез более подвижных энзимов обусловлен локусом *Amy 2*. Результаты по локализации *Amy 2* в хромосоме 1 (=7H) представлены ранее [6].

На рис. 3 приведены зимограммы родителей и потомства $F_2$ комбинации скрещивания Risø M13 × r “e” + o. Как видно, различия между изоферментами AMY 1–6 и AMY 1–7, контролируемые локусом *Amy 1*, затрагивают только верхнюю часть спектра. Risø M13 не имеет активности в самой верней части зимограммы. Напротив, у родителя r “e” + o в этой части спектра наблюдается энзиматическая активность (отмечено стрелкой).

Результаты расщепления потомства $F_2$ (тестирование по $F_3$) комбинации Risø M13 × r “e” + o и оценка сцепления между генами, по которым отличались родители, представлены в табл. 1. Как видно, гены хромосомы 6 (=6H) обнаружили между собой сцепление. С другой стороны, локус *V* (=*Vrs1*) двурядный колос, *v* (=*vrs1*) шестирядный колос находятся в хромосоме 2 (=2H) и, соответственно, показано независимое наследование со всеми генами хромосомы 6.

На основе полученных данных можно составить карту сцепления пяти изученных генов хромосомы 6 (рис. 2). Следует отметить, что порядок расположения исследуемых генов не совпадает с генетической картой этой хромосомы ячменя, представленной ранее [8, 9].

Из показанных на рис. 3 генов, фактор *Oo* подвергался телотрисомному анализу. В результате было установлено, что ген *o* (оранжевая окраска цветковой чешуи) находится в коротком плече хромосомы 6 [13]. В дальнейшем D. Falk [14, 15], пользуясь этим же методом, подтвердил положение локуса *o* в коротком плече хромосомы 6 и установил, что ген *sex 1* находится проксимально, в длинном плече этой хромосомы. Следовательно, центромера ориентирована между генами *o* и *Sex 1*. Положение других представленных здесь генов этой хромосомы с помощью телотрисомного анализа по плечам не исследовано. На обобщенных картах сцепления этой хромосомы [8, 9] локусы *r* “*e*”, *gs 4*, *Sex 1* расположены в длинном плече хромосомы 6. В частности R. Yoshimi и T. Konishi [16] при картировании локусов *Aat* и *l9* относительно гена *o* отнесли его положение к длинному плечу хромосомы 6 проксимально. Они не учли более ранних сообщений [13–15] о переносе положения гена *o* в короткое плечо этой хромосомы около

центромеры. Соответственно в последнем описании этих генов и хромосомном положении их на картах сцепления указано длинное плечо хромосомы 6 (6L) [10].

К настоящему времени имеются достаточно подробные карты сцепления хромосомы 6 ячменя [17, 18]. К сожалению они охватывают только ДНК-маркеры, но не включают гены, отвечающие за морфологические признаки растений ячменя. В то же время следует отметить, что местоположение локуса *Amy 1* относительно этих маркеров на хромосоме 6 указано. Так, по данным X. Qi с соавт. [17] *Amy 1* занимает положение в 84.9 сМ на карте хромосомы 6, но плечо не указано. P. Langridge с соавт. [18] отметили положение центромеры на этой хромосоме и показали, что локус *Amy 1* находится на расстоянии в 19.6 сМ от центромеры в длинном плече хромосомы 6. При использовании картирующей функции D. Kozambi [19] оценка расстояния между генами *Sex 1* и *Amy 1* в нашем случае составила 20.00 ± 5.71 сМ. Если рассчитывать это расстояние на основе картирующей функции N. Bailey [20], оно будет равно 23.5 ± 7.86 сМ. Следовательно, учитывая ошибку оценки дистанции, в обоих случаях очевидно, что данные P. Langridge с соавт. [18] близки к нашим результатам. Тогда наиболее вероятно, что ген *Sex 1* действительно может находиться в длинном плече вблизи центромеры хромосомы 6; это не противоречит приведенным выше данным, а также подтверждает сведения D. Falk [14, 15]. Расположение локусов *Aat* и *l9* в длинном плече хромосомы 6 согласуется с полученными нами данными, и укладывается в карту сцепления этих генов относительно локусов *Amy 1* и *o*.

Таким образом, на основе учета данных по величинам рекомбинации R. Yoshimi и T. Konishi [16] наиболее вероятен следующий порядок расположения представленных локусов: 6*S*– *o*– cen – *Sex 1* – *Amy 1* – *Aat* – *l9* – 6L. Это допустимо при условии нахождения сегмента *Aat* – *l9* в длинном плече хромосомы 6. К сожалению для картирования этого участка хромосомы недостаточно одного маркерного гена *o*, который использовали R. Yoshimi и T. Konishi [16].

При обобщении полученных нами результатов и представленных литературных данных наиболее вероятное расположение изученных нами генов относительно друг друга и по плечам на хромосоме 6 иллюстрирует рис. 2. Таким образом, на основе пятиточечного теста установлен порядок расположения пяти локусов в хромосоме 6 (=6H) ячменя: **6S** – *r*"*e*" (=*raw 5*) – *gs 4* (=*gsh 4*) – *o* (=*rob 1*) – *cen* – *Sex 1* – *Amy 1* – **6L**.

Представленные данные свидетельствуют о необходимости корректировки генетической карты сцепления хромосомы 6 (=6H) ячменя. Эти изменения затрагивают четыре локуса, контролирующих морфологические признаки ячменя.

Работа выполнена по Госзаданию: № 007-00489-18-00.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Schwimmer S.* The malt amylases // Brewers Digest. 1951. V. 26. P. 47–52.
2. *Harris G.* The enzyme content and enzymatic transformation of malt // Barley and Malt / Ed. Cook A.H. N.Y., London, 1962. P. 583–894.
3. *Frydenberg O., NielsenG.* Amylase isozymes in germinating barley seeds // Hereditas. 1966. V. 54. № 8. P. 123–139.
4. *Brown A.H.D., Jacobsen J.V.* Genetic basis and natural variation of α-amylase isozymes in barley // Genet. Res. Cambr. 1982. V. 40. P. 315–324. https://doi.org/10.1017/S0016672300019182
5. *Нецветаев В.П.* Расположение β-амилазного локуса (*Bmy 1*) в хромосоме 4 ячменя // Цитология и генетика. 1993. Т. 27. № 5. С. 74–78.
6. *Netsvetaev V.P.* Chromosomal location of loci *Estl2* and *Amy2* in barley // Barley Genet. Newsletter. 1993. V. 22. P. 42–43.
7. *Nielsen G., Frydenberg O.* Linkage between the loci *Amy 1* (α-amylase), *o* (orange lemma) and $x_n$ (xanta seedling) // Barley Genet. Newsletter. 1974. V. 4. P. 53–54.
8. *Søgaard B., Von Wettstein-Knowless P.* Barley: Genes and chromosomes // Carlberg Res. Communications. 1987. V. 52. № 2. P. 123–196.
9. *Tsuchiya T.* Linkage maps of barley // Barley Genet. Newsletter. 1984. V. 14. P. 81–84.
10. *Franckowiak J.D., Lundqvist U.* Descriptions of barley genetic stocks tables 2 and 3 (2018) // Barley Genet. Newsletter. 2018. V. 48. P. 13–189.
11. *Рокицкий П.Ф.* Введение в статистическую генетику. Минск: Вышейшая школа, 1974. 442 с.
12. *Allard R.W.* Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity // Hilgardia. 1956. V. 24. № 10. P. 235–278.
13. *Shahla A., Shim J.W., Tsuchiya T.* Association of the gene o for orange lemma with the short arm of chromosome 6 (6S) in barley // Barley Genet. Newsletter. 1983. V. 13. P. 83–84.
14. *Falk D.E.* Creation of a marked telo 6S trisomic for chromosome 6 // Barley Genet. Newsletter. 1993. V. 23. P. 32.
15. *Falk D.E.* Coordinator's report: Chromosome 6 // Barley Genet. Newsletter. 1993. V. 23. P. 154.

16. *Yoshimi R., Konishi T.* Linkage analysis of several isozime loci in barley // Barley Genet. Newsletter. 1994. V. 24. P. 35–37.

17. *Qi X., Stam P., Lindhout P.* Comparison and integration of four barley genetic maps // Genome. 1996. V. 39. P. 379–394. https://doi.org/10.1139/g96-049

18. *Langridge P., Karakousis A., Collins N. et al.* A consensus linkage map of barley // Mol. Breeding. 1995. V. 1. P. 389–395.

19. *Kozambi D.* The estimation of map distances from recombination values // Ann. Eugen. 1944. V. 12. P. 172–175.

20. *Bailey N.T.J.* Introduction to the Mathematical Theory of Linkage. Oxford: Univ. Press, 1961. 56 p.

# Linkage Analysis of Genes Controlling the Qualitative Characteristics of Barley Plants in Chromosoma 6

**V. P. Netsvetaev***

*Belgorod Federal Agrarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Belgorod, 308001 Russia*
**e-mail: v.netsvetaev@yandex.ru*

Based on the genetic analysis of $F_2$ by $F_3$ in the combination M13 × r "e" + o, the recombination frequencies between genetic factors of chromosome 6 (=6H) barley were estimated. The study included the following genes: *r* "*e*" (smooth awns "e"), *sex 1* (shrunken endosperm xenia 1), *o* (orange lemma 1), *gs 4* (glossy sheath 4), *Amy 1–7* (α-amylase 1, type 7). The *Amy 1* locus was identified by separation of alpha-amylase by electrophoresis at pH 8.3. Based on the five-point test, the following order to location of the studied loci in chromosome 6 (=6H) was established: **6S** – *r* "*e*" (=*raw 5*) – *gs 4* (=*gsh 4*) – *o* (=*rob 1*) – **cen** – *Sex 1* – *Amy 1* – **6L**.The linkage estimation and literature analysis showed that among the indicated genes, the *Amy 1* and *Sex 1* loci are located in the long arm of chromosome 6. The other genetic factors are associated with the short arm of this chromosome. The centromere is between the genetic factors of *Sex 1* and *o* (=*rob 1*). In general, the data presented indicate the need to review the genetic linkage map of chromosome 6 (=6H) barley.

**Keywords:** barley, recombination, genes, linkage map, alpha-amylase isoenzymes, chromosome 6 (=6H).