

Я.Ю. ШАРЫПИНА,
В.Н. ПОПОВ, В.В. КИРИЧЕНКО

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева,
пр. Московский, 142, Харьков, 61060, Украина

ПОЛИМОРФИЗМ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ НЕКОТОРЫХ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ У МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА



Исследован полиморфизм шести изоферментных систем (ME, EST, 6-PGD, AAT, ACP, IDH) мутантных инбредных линий подсолнечника, из которых только три оказались полиморфными (ME, EST, 6-PGD). У каждой полиморфной ферментной зоны выявлено по две изоформы. Изучен генетический контроль малик-энзима и установлено, что идентифицированная полиморфная зона этого фермента находится под контролем одного гена. Гены, контролирующие синтез малик-энзима, анодной эстеразы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, наследуются независимо по отношению друг к другу.

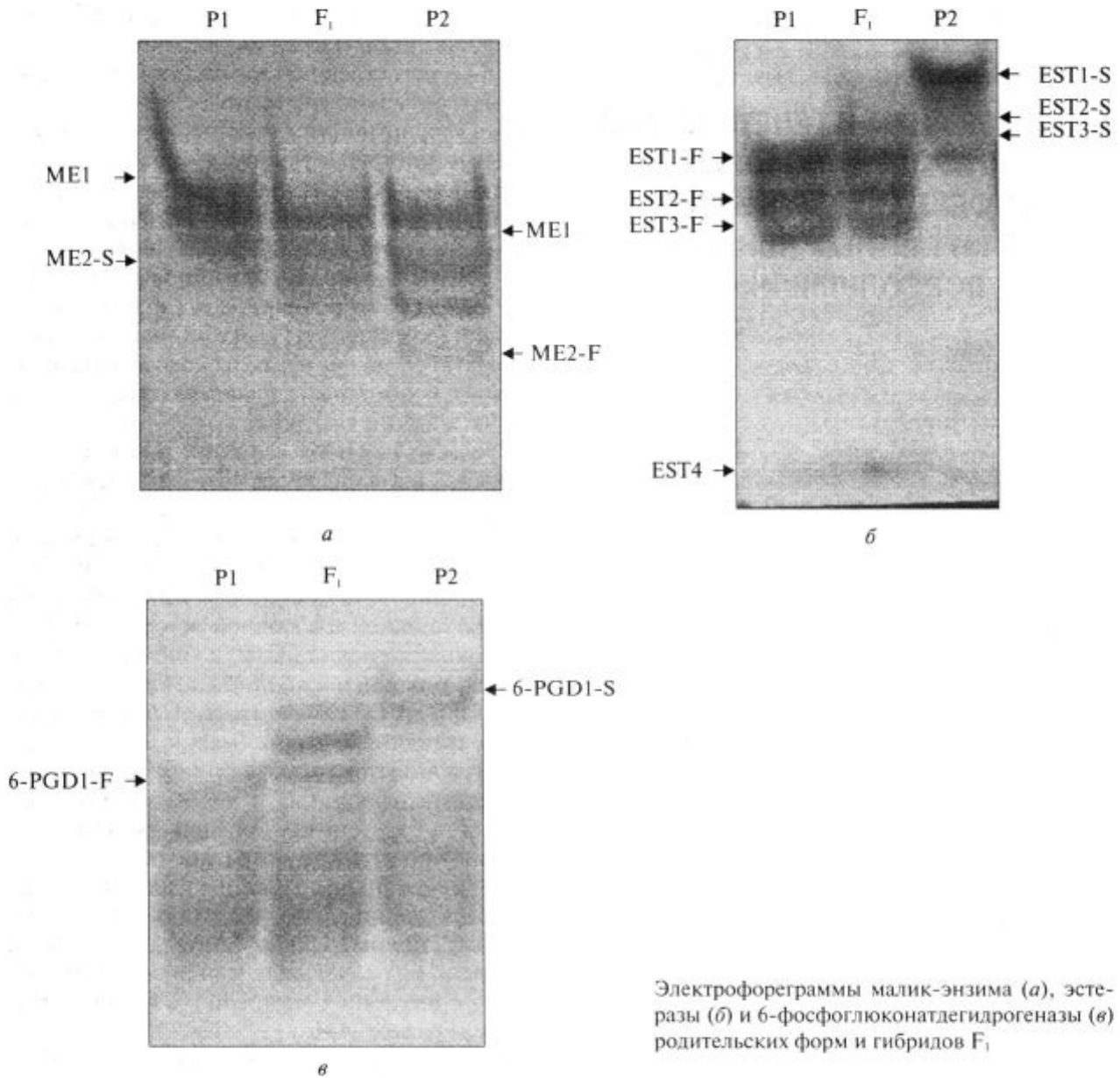
© Я.Ю. ШАРЫПИНА, В.Н. ПОПОВ,
В.В. КИРИЧЕНКО, 2006

Введение. Оптимизация селекционного процесса возможна за счет привлечения различных молекулярных маркеров, в том числе и биохимических, которые нашли широкое применение в разных селекционно-генетических программах сельскохозяйственных культур [1, 2]. Молекулярно-генетические маркеры являются удобным инструментом для детального маркирования морфологических признаков, особенно имеющих селекционное значение [3—5], выявления интрогрессии чужеродного материала [6], идентификации генотипов [7, 8]. Однако прежде чем использовать определенную маркерную систему в селекционных и генетических исследованиях сельскохозяйственных культур, необходимо изучить ее изменчивость и генетический контроль.

Среди культурных растений подсолнечник наименее изучен с точки зрения биохимической генетики. К настоящему времени накоплено детальная информация о генетическом контроле запасного белка подсолнечника гелиантинина [9, 10], некоторых изоферментных систем: анодной и катодной эстеразы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, анодной и катодной кислой фосфатазы [11—13] и др. Об изменчивости НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (малик-энзим) в литературе имеются только единичные сведения, при этом информация о наследовании этого фермента отсутствует. Так, при изучении 146 образцов подсолнечника разного происхождения (дикорастущие виды и культурные формы) было установлено, что малик-энзим имеет одну полиморфную зону, для которой выявлено два аллельных варианта, встречающихся с различной частотой в изученной выборке образцов [14].

Цель настоящего исследования — изучить генетический контроль НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы и выяснить наличие сцепления между генами, контролирующими эту и другие изоферментные системы.

Материалы и методы. В качестве исследуемого материала были использованы 23 инбредные линии подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) мутантного происхождения, созданные в отделе селекции масличных культур Института растениеводства им. В.Я. Юрьева. Выбор материала связан с вовлечением его в селекционный процесс по созданию гибридов с различным жирнокислотным составом, устойчивых к болез-



Электрофореграммы малик-энзима (а), эстеразы (б) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (в) родительских форм и гибридов F₁

ням и другими хозяйственно полезными признаками.

Для выявления возможной внутрелинейной гетерогенности у каждой линии анализировали не менее 50 семян.

Гибриды первого поколения получали путем скрещивания гомозиготных линий подсолнечника, контрастных по изучаемым признакам. Кастрацию трубчатых цветков и их обработку пылью отцовской формы проводили по общепринятой методике [15]. Рассепающиеся популяции F₂ получали путем

самоопыления индивидуальных корзинок F₁ под пергаментными изоляторами.

Для изучения генетического контроля ферментных систем были созданы четыре гибридные комбинации F₂: Mx1829B × Mx42, Mx1823B × Mx42, Mx4B × Mx42 и Mx42 × Mx4B. Выборка по каждой комбинации скрещивания составила 105, 96, 94 и 95 семян соответственно.

Экстракцию ферментов из семян и их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли по описанной

ранее методике [13], а гистохимическое окрашивание ферментов проводили по методике Shaw и Prasad [16] с модификациями. Изучали следующие ферментные системы: НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа (ME, К.Ф.1.1.1.40), анодная эстераза (EST, К.Ф.3.1.1.1), изоцитратдегидрогеназа (IDH, К.Ф.1.1.1.42), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD, К.Ф.1.1.1.44), анодная кислая фосфатаза (ACP, К.Ф.3.1.3.2) и аспаратаминотрансфераза (AAT, К.Ф.2.6.1.1).

Проверку нулевой гипотезы о соответствии фактического расщепления теоретически ожидаемому, а также тест на сцепление между генами проводили с применением критерия χ^2 [17].

Результаты исследований и их обсуждение. В результате анализа шести изоферментных систем у инбредных линий подсолнечника было выявлено, что только три из них (ME, EST и 6-PGD) являются полиморфными, спектр которых различается по электрофоретической подвижности компонентов и их активности. У остальных ферментных систем исследованных линий выявлен мономорфизм, т.е. наличие идентичного спектра по каждому ферменту. Анализ инбредных линий подсолнечника на предмет выявления внутрилинейной изменчивости по изоферментным системам показал, что весь изученный исходный материал является гомозиготным, и это дало нам основание вовлечь его в дальнейшие исследования.

Малик-энзим (К.Ф.1.1.1.40). При изучении изменчивости малик-энзима у инбредных линий подсолнечника были выявлены две основные зоны активности этого фермента (ME1 и ME2), между которыми проявлялись также дополнительные компоненты (рисунок). Первая зона ферментативной активности была мономорфной, а во второй идентифицированы две изоформы, различающиеся электрофоретической подвижностью и обозначенные нами как F (быстро мигрирующая) и S (медленно мигрирующая) формы. Ранее, изучая изменчивость малик-энзима на других инбредных линиях подсолнечника, нами было показано, что первая зона активности фермента также имела две изоформы — F и S [18]. У многих видов растений малик-энзим по своей структуре описан как тетрамер, поэтому выявленные компоненты, которые по электрофоретической подвижности расположены

между основными ферментативными зонами, по-видимому, могут являться продуктами межгенного взаимодействия. Было обнаружено, что некоторые компоненты как в пределах одного генотипа, так и между разными генотипами отличались по своей интенсивности. Это может быть связано с различной ферментативной активностью и концентрацией фермента у исследованных линий подсолнечника.

Для изучения генетического контроля НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы и установления сцепления между генами, контролирующими синтез изоформ, скрещивали контрастные по этому ферменту формы подсолнечника, которые также различались и по другим ферментным системам.

Анализ первого поколения, полученного от скрещивания линий, которые различаются по подвижности компонентов, выявленных для второй зоны активности фермента, показал, что во всех гибридных комбинациях первая зона оставалась без изменений, т.е. была мономорфной, а остальной спектр имел несколько характерных особенностей (рисунок). Во-первых, выявляемый ниже первой зоны активности спектр у гибридов не разделялся на четкие компоненты и представлял собой размытый фронт. Во-вторых, активность фермента уменьшалась по мере продвижения фронта в геле и его нижняя граница имела промежуточное расположение по отношению к быстро и медленно мигрирующим компонентам, которые выявлены у родительских форм. Характерные особенности в активности малик-энзима у гибридов первого поколения, вероятно, связаны со сложными взаимодействиями между субъединицами тетрамерного комплекса фермента, которые могут иметь место начиная с момента синтеза полипептидов и заканчивая их сборкой в тетрамерную молекулу фермента.

При изучении наследования малик-энзима в гибридных комбинациях F_2 мы выявили три типа спектров. Первые два спектра были идентичны обеим родительским формам, а третий — идентичен спектру, который выявлялся в F_1 и представлял собой, вероятно, взаимодействие аллельных вариантов одного гена, а также между разными генами, которые контролируют продукты, выявляемые в зонах ME1 и ME2.

Таблица 1

Анализ расщепления в F₂ у межлинейных гибридов подсолнечника по электрофоретическим вариантам

| Комбинация скрещивания | ME2 | | | EST1, EST2, EST3 | | | 6-PGD1 | | |
|------------------------|-------------------------|----------|-----------------|-------------------------|----------|-----------------|-------------------------|----------|-----------------|
| | Фактическое расщепление | χ^2 | P | Фактическое расщепление | χ^2 | P | Фактическое расщепление | χ^2 | P |
| Mx1829B × Mx42 | 22:54:29 | 1,02 | 0,70 < P < 0,80 | 30:48:27 | 0,93 | 0,70 < P < 0,80 | 32:54:19 | 3,31 | 0,10 < P < 0,20 |
| Mx1823B × Mx42 | 28:51:17 | 2,9 | 0,20 < P < 0,30 | 20:54:22 | 1,59 | 0,30 < P < 0,50 | 21:57:18 | 3,57 | 0,10 < P < 0,20 |
| Mx4B × Mx42 | 32:45:17 | 4,96 | 0,05 < P < 0,10 | 23:42:29 | 1,83 | 0,30 < P < 0,50 | 25:41:28 | 1,73 | 0,30 < P < 0,50 |
| Mx42 × Mx4B | 23:50:22 | 0,28 | 0,80 < P < 0,90 | 25:43:27 | 0,94 | 0,70 < P < 0,80 | 24:40:31 | 3,39 | 0,10 < P < 0,20 |

При анализе рецiproкных скрещиваний (Mx4B × Mx42 и Mx42 × Mx4B) не было установлено влияние материнского генотипа на проявление спектра фермента, а также на характер расщепления в F₂. В результате анализа F₂ соотношение фенотипических классов было 1 : 2 : 1, что соответствует теоретически ожидаемому расщеплению при моногенном наследовании (табл. 1). Принимая во внимание полученные данные, можно сказать, что у изученных инбредных линий подсолнечника выявлен многокомпонентный спектр малик-энзима, различающийся не только по относительной интенсивности компонентов, но и по подвижности изоферментов зоны ME2, которые находятся под контролем одного гена, обозначенного условно как *Me1*. Однако это не исключает возможности того, что малик-энзим имеет более сложный генетический контроль. Так, можно предположить, что первая ферментативная зона активности также контролируется одним геном, но для установления генетического контроля этой ферментной зоны необходимо осуществить скрещивания между контрастными формами и провести гибридологический анализ.

Прежде чем приступить к анализу сцепления между геном *Me1* и другими генами, контролирующими синтез эстеразы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, мы изучили наследование последних в F₁ и F₂.

Анодная эстераза (К.Ф.3.1.1.1). Особенности генетического контроля анодной эстеразы в крахмальном геле описаны авторами работ [11, 12]. Нами также изучалось наследование анодной эстеразы у инбредных линий подсолнечника [13]. Данные, которые получены на-

ми и авторами других работ, противоречивы, что в первую очередь, на наш взгляд, связано с использованием разных модификаций метода электрофореза. При использовании крахмального геля Лоскутов и др. [12] наблюдали одну широкую ферментативную зону эстеразы. Для выявления возможных различий по этому ферменту нами был применен ПААГ, в котором удалось разделить спектр на четыре компонента, имеющие органоспецифическое проявление [13]. Установленные в настоящей работе спектры анодной эстеразы в ПААГ при изучении семян подсолнечника мутантных линий соответствуют спектрам, полученным нами ранее [13]. Первые три ферментные зоны (EST1, EST2, EST3) выявили субстратную специфичность к α -нафтилацетату, а EST4 — к β -нафтилацетату. Изоформы EST1, EST2, EST3, за исключением EST4, отличались по электрофоретической подвижности. Выявленные аллельные варианты описаны нами как медленный (S) и быстрый (F) компоненты. Для анодной эстеразы также характерно наличие очень быстрой изоформы (vF), которая была описана нами [18] при изучении других селекционных линий подсолнечника, и частота ее по сравнению с другими аллельными вариантами достаточно низкая — 0,087. В проанализированных нами в настоящей работе линиях очень быстрая изоформа (vF) отсутствует.

Изоферментный спектр гибридов первого поколения представлял собой сочетание компонентов, которые выявляли у родительских форм, что свидетельствует о кодоминантном типе наследования.

Генетический анализ анодной эстеразы, проведенный на четырех расщепляющихся попу-

Оценка сцепления между генами, контролирующими ферменты

| Комбинация скрещивания и гены | Генотипы F ₂ | FF | FS | SS | χ ² | Тип наследования | |
|-------------------------------|-------------------------|----|-----------------------|----|----------------|------------------|--------------------------|
| Mx1829B × Mx42 | <i>Me1</i> | | <i>Est1-Est2-Est3</i> | | | 6,73 | Независимое наследование |
| | | FF | 11 | 15 | 4 | | |
| | | FS | 14 | 23 | 11 | | |
| | <i>Me1</i> | | <i>6-Pgd1</i> | | | 9,17 | То же |
| | | FF | 4 | 13 | 13 | | |
| | | FS | 13 | 25 | 10 | | |
| | <i>6-Pgd1</i> | | <i>Est1-Est2-Est3</i> | | | 4,19 | * |
| | | FF | 7 | 16 | 9 | | |
| | | FS | 10 | 27 | 17 | | |
| Mx1823B × Mx42 | <i>Me1</i> | | <i>Est1-Est2-Est3</i> | | | 8,92 | * |
| | | FF | 3 | 11 | 6 | | |
| | | FS | 13 | 30 | 11 | | |
| | <i>Me1</i> | | <i>6-Pgd1</i> | | | 7,42 | * |
| | | FF | 5 | 9 | 6 | | |
| | | FS | 17 | 28 | 9 | | |
| | <i>6-Pgd1</i> | | <i>Est1-Est2-Est3</i> | | | 7,50 | * |
| | | FF | 6 | 12 | 3 | | |
| | | FS | 18 | 28 | 11 | | |
| Mx4B × Mx42 | <i>Me1</i> | | <i>Est1-Est2-Est3</i> | | | 9,62 | * |
| | | FF | 5 | 10 | 8 | | |
| | | FS | 13 | 21 | 8 | | |
| | <i>Me1</i> | | <i>6-Pgd1</i> | | | 9,79 | * |
| | | FF | 8 | 11 | 4 | | |
| | | FS | 12 | 23 | 7 | | |
| | <i>6-Pgd1</i> | | <i>Est1-Est2-Est3</i> | | | 10,68 | * |
| | | FF | 9 | 11 | 5 | | |
| | | FS | 12 | 24 | 5 | | |
| Mx42 × Mx4B | <i>Me1</i> | | <i>Est1-Est2-Est3</i> | | | 9,34 | * |
| | | FF | 8 | 13 | 4 | | |
| | | FS | 10 | 16 | 17 | | |
| | <i>Me1</i> | | <i>6-Pgd1</i> | | | 3,78 | * |
| | | FF | 6 | 11 | 8 | | |
| | | FS | 10 | 26 | 7 | | |
| | <i>6-Pgd1</i> | | <i>Est1-Est2-Est3</i> | | | 5,55 | * |
| | | FF | 7 | 10 | 7 | | |
| | | FS | 9 | 22 | 9 | | |
| | SS | 7 | 18 | 6 | | | |

ляциях F_2 , показал, что компоненты (EST1, EST2, EST3) наследуются в виде тесно сцепленной группы и рекомбинаций в ее пределах не обнаружено. Можно предположить, что такой тип наследования связан с дупликацией одного предкового гена в процессе эволюции рода *Helianthus*. Подобное наследование в виде тесно сцепленных групп также описано для трех генов, контролирующих синтез эстеразы у ржи [19].

При анализе семян F_2 выявлены три типа электрофоретических спектров. Два из них идентичны исходным родительским компонентам, а третий соответствует спектру, наблюдаемому в F_1 . В каждой расщепляющейся комбинации фактическое соотношение фенотипических классов соответствовало теоретически ожидаемому 1:2:1, что свидетельствует о кодоминантном типе наследования при моногенном контроле (табл. 1). Выявленные зоны активности фермента контролируются тремя генами, обозначенными нами как *Est1*, *Est2* и *Est3*. Мономорфная зона EST4, по-видимому, контролируется геном *Est4*, который был идентифицирован ранее [13].

6-фосфоглюконатдегидрогеназа (К.Ф.1.1.1.44). В спектрах другого фермента — 6-PGD обнаружены четыре зоны ферментативной активности, из которых три быстро мигрирующие зоны мономорфны, а в медленно мигрирующей наблюдали полиморфизм, проявляющийся различием в электрофоретической подвижности выявленных компонентов. Аллельные варианты также определены как формы S и F и описаны ранее [11, 12, 18].

У потомков гибридов F_1 от скрещивания контрастных по 6-PGD форм наблюдалась дополнительная гибридная зона активности фермента, имеющая промежуточное расположение между быстро и медленно мигрирующими компонентами, образование которой, вероятно, связано с межallelными взаимодействиями одного гена. Такой трехполосный спектр гетерозиготы подтверждает димерную природу этого фермента.

При анализе F_2 в полиморфной зоне наблюдали расщепление на три типа спектров, два из которых были идентичны родительским, а третий соответствовал гибридному. Соотношение выявленных классов было 1 : 2 : 1, что

подтверждает контроль активности полиморфной зоны этого фермента геном *6-Pgd1* с двумя кодоминантными аллелями (табл. 1).

Сцепление. Наличие полиморфизма по трем изоферментным системам у изученных линий подсолнечника позволило после установления генетического контроля провести анализ на совместное наследование генов, кодирующих эти ферментные системы. Результаты сцепления между генами приведены в табл. 2. Проверка гипотезы на независимое наследование генов, под контролем которых находятся изученные ферментные системы, при теоретически ожидаемом расщеплении 1:2:1:2:4:2:1:2:1 позволила установить, что они наследуются независимо и, по-видимому, находятся в разных группах сцепления.

Таким образом, нами установлен генетический контроль полиморфной зоны НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы, которая контролируется одним геном — *Me1*. Механизм формирования многокомпонентного спектра у родительских форм и F_1 заслуживает дальнейшего изучения с привлечением других методов анализа белков. Установлено, что гены, контролирующие изученные ферментные системы, наследуются независимо и, вероятно, принадлежат к разным группам сцепления. Полученные данные позволяют дополнить информацию о частной генетике подсолнечника, а именно, изученные гены при установлении их хромосомной локализации могут служить маркерами определенной хромосомы и быть включены в анализ по маркированию генов, ответственных за проявление хозяйственно ценных признаков.

Авторы выражают благодарность С.Г. Понуренко, научному сотруднику отдела генетики Института растениеводства им. В.Я. Юрьева, за ценные замечания и обсуждение результатов настоящей работы.

SUMMARY. Polymorphism of six isozyme systems (ME, EST, 6-PGD, AAT, ACP, IDH) of sunflower mutant inbred lines has been studied. It was shown that only three of them were polymorphic (ME, EST, 6-PGD). Two isoforms were observed for each polymorphic enzymic zone. Genetic control of malic-enzyme has been studied and it was determined that the identified polymorphic zone of the

enzyme was controlled by one gene. The genes of malic enzyme synthesis, anodal esterase and 6-phosphogluconat dehydrogenase are inherited independently.

РЕЗЮМЕ. Вивчено поліморфізм шести ізоферментних систем (ME, EST, 6-PGD, AAT, ACP, IDH) мутантних інбредних ліній соняшника, серед яких тільки три були поліморфними (ME, EST, 6-PGD). У кожній поліморфній ферментній зоні виявлено дві ізоформи. Вивчено генетичний контроль малік-ензиму та встановлено, що ідентифікована поліморфна зона цього ферменту знаходиться під контролем одного гена. Гени, які контролюють синтез малік-ензиму, анодної естерази і 6-фосфоглюконатдегідрогенази, успадковуються незалежно відносно один одного.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. — Новосибирск : Наука, 1985. — 145 с.
2. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. — СПб : ВИР, 2001. — 418 с.
3. Терновская Т.К. Хромосомная локализация главных генов количественных признаков (QTL) пшеницы с использованием генов-маркеров D хромосомы // Цитология и генетика. — 2000. — 34, № 2. — С. 16—23.
4. Доменюк В.П., Белоусов А.А., Сиволап Ю.М. ДНК-маркирование количественных признаков кукурузы // Цитология и генетика. — 2002. — 36, № 6. — С. 12—19.
5. Єгорова Т.В. Ефективність поєднання діалельних схрещувань та методу генетичного маркування для гібридологічного аналізу вівса посівного (*Avena sativa* L.): Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2003. — 19 с.
6. Besard G., Grivean Y., Quillet M.C., Serieys H. et al. Specifying the introgressed regions from *H. argophyllus* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) to mark Phomopsis resistance genes // Theor. Appl. Genet. — 1997. — 94. — P. 131—138.
7. Бочковой А.Д., Савченко В.Д., Туркав С.З. Идентификация селекционного материала по спектру изоферментов // Науч.-техн. бюл. ВНИИМК. — 1997. — Вып. 118. — С. 50—51.
8. Солоденко А.Е., Саналатий А.В., Сиволап Ю.М. Идентификация генотипов подсолнечника с помощью микросателлитных маркеров // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 2. — С. 15—19.
9. Попереля Ф.А., Нецветаев В.П. Генетический контроль гелиантинина семян у подсолнечника // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 4. — С. 59—63.
10. Анисимова И.Н. Запасные белки семян подсолнечника: гетерогенность, полиморфизм, генетический контроль : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — СПб, 1999. — 39 с.
11. Kahler A.L., Lay C.L. Genetics of electrophoretic variants in the annual sunflower // J. Hered. — 1985. — 76. — P. 335—340.
12. Лоскутов А.В., Боровкова И.Г., Боровков А.Ю. Генетический анализ изоферментных вариантов подсолнечника // Науч.-техн. бюл. ВНИИМК. — 1988. — Вып. 4(103). — С. 22—28.
13. Kirichenko V.V., Popov V.N. Genetics of isozymes and analysis of isozymes linkage and morphological loci in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Helia. — 2000. — 23, № 33. — P. 65—76.
14. Cronn R., Brothers M., Klier K., Bretting P.K., Wendel J.F. Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives // Theor. Appl. Genet. — 1997. — 95. — P. 532—545.
15. Частная селекция полевых культур / Под ред. Ю.Б. Коновалова. — М.: Агропромиздат, 1990. — 544 с.
16. Shaw C.R., Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes — a compilation of recipes // Biochem. Genet. — 1970. — 4, № 2. — P. 297—320.
17. Орлова Н.Н. Генетический анализ. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. — 318 с.
18. Попов В.М. Використання молекулярно-генетичних маркерів в генетико-селекційних дослідженнях соняшника : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2002. — 19 с.
19. Wehling P., Schmidt-Stohn G. Linkage relationships of esterase loci in rye // Theor. Appl. Genet. — 1984. — 67. — P. 149—153.

Поступила 24.05.05