

УДК 633.854.78:631.52

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА МЕТОДОМ ИЗОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

**С.З. Гучетль,**

кандидат биологических наук

**Т.А. Челюстникова,**

научный сотрудник

**Т.С. Антонова,**

доктор биологических наук

ФГБНУ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

E-mail: saida.guchetl@mail.ru

*Для цитирования:* Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Антонова Т.С. Некоторые особенности определения генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника методом изоферментного анализа // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2015. – Вып. 4 (164). – С. 14–19.

**Ключевые слова:** подсолнечник, линии, гибриды, генетическая чистота, изоферментные локусы.

Основной задачей семеноводства гибридов подсолнечника является поддержание на высоком уровне генетической чистоты самоопыленных линий и гибридов. Метод анализа изоферментных спектров эффективен для контроля генетической чистоты партий семян. В лаборатории иммунитета и молекулярного маркирования ВНИИМК на протяжении многих лет данным методом проводится оценка генетической чистоты самоопыленных линий с участков размножения и гибридов F<sub>1</sub> с участков гибридизации. Целью данной работы является характеристика особенностей, которые возникают при анализе генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника. Материалом для исследования служили партии семян самоопыленных родительских линий и гибридов первого поколения подсолнечника селекции ВНИИМК. Для характеристики партий семян использовали метод анализа электрофоретических спектров пяти изоферментных систем. Генетическая чистота простых гибридов может оцениваться по всем анализируемым изоферментным локусам, но уровень гибридности определяется лишь по локусам,

находящимся в гетерозиготном состоянии. Если одна из родительских форм трехлинейных гибридов находится в гетерозиготном состоянии по какому-либо из изоферментных локусов, то в F<sub>1</sub> по этому признаку наблюдается расщепление по типу анализирующего и генетическая чистота гибрида определяется только с помощью тех изоферментных локусов, которые находятся в гомо- или гетерозиготном состоянии. Это ведет к уменьшению количества анализируемых маркерных систем и к уменьшению точности оценки генетической чистоты партий семян. У селекционных линий может присутствовать внутрилинейная изменчивость признаков, по которым отбор не ведется, что может приводить к занижению показателей типичности при оценке методом изоферментов. Рекомендовано при формировании маточников линий коммерческих гибридов проводить анализ изоферментов с целью выбраковки потомств, гетерогенных хотя бы по одной системе.

UDC 633.854.78:631.52

**Some features of determination of a genetic purity of sunflower lines and hybrids by a method of isozyme analysis.**

**Guchetl S.Z.**, candidate of biology

**Tchelustnikova T.A.**, researcher

**Antonova T.S.**, doctor of biology

FGBNU VNIIMK

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

saida.guchetl@mail.ru

**Key words:** sunflower, lines, hybrids, genetic purity, isozyme loci.

The main task of sunflower hybrid seed growing is maintenance on a high level of genetic purity of sunflower hybrids and inbreds. The method of analysis of isozyme spectra is effective for control of the genetic purity of seed lots. At the laboratory of immunity and molecular marking of VNIIMK the genetic purity of inbreds from the multiplication plots and F<sub>1</sub> hybrids from the hybridization plots have been analyzing by this method for a long time. The purpose of this work is a characteristic of peculiarities appearing at analyzing of the genetic purity of sunflower lines and hybrids. Sunflower seeds of self-pollinated parental lines and F<sub>1</sub> hybrids NIIMK breeding were used as material for research. For description of seed lots there was used a method of analysis of electrophoretic spectra of five isozyme systems. Genetic purity of simple hybrids can be estimated on all analyzed isozyme loci but a level of hybridization is determined only by loci being in heterozygous state. If one of the parental form of three-way hybrids is in heterozygous state due to any isozyme loci then in F<sub>1</sub>

this trait specifies segregation on analyzing type and the genetic purity of a hybrid is determined only by those loci which are in homo- or heterozygous state. This leads to decreasing of a quantity of analyzed marker systems and to lowering of accuracy of estimation of the seed lots genetic purity. There can be in-line variability of traits at breeding lines which are not used for selection. And this can cause underestimation of indicators of typicality at using the method of isozymes for analysis. At formation of plots for growing of breeders seeds of lines of commercial hybrids it is recommended to analyze isozymes with a purpose to discard progenies heterogenic even though on one system.

Основными задачами семеноводства гибридов подсолнечника являются поддержание на высоком уровне генетической чистоты самоопыленных линий, сохранение их типичности и однородности по морфологическим и хозяйственно ценным признакам в процессе репродукции, обеспечение 100 % гибридизации в процессе получения семян гибридов первого поколения.

Оценку качества семян на генетическую чистоту производят разными способами, в том числе с использованием полевой оценки посевов (грунт-контроля) и лабораторного анализа. Проведение грунт-контроля до начала реализации семян в условиях Российской Федерации сопряжено с большими трудностями, т.к. его необходимо проводить в зимний период [1]. Для полевой оценки посевов требуется дополнительный год. Кроме того, возможности использования традиционных признаков, таких, например, как морфологические, ограничены четкостью их фенотипического проявления. Лабораторный контроль осуществляется на основе изоферментов, белковых и молекулярных маркеров. Изоферментные локусы обладают следующими необходимыми для генетических маркеров свойствами: имеют кодоминантную экспрессию, позволяющую отличать гибриды от неконтролируемого опыления, выявлять самоопыленные растения и механическую примесь. Их экспрессию можно наблюдать в семенах или проростках, что существенно ускоряет достижение ре-

зультата, т.к. не надо ждать созревания растения. Их экспрессия, в отличие от морфологических маркеров, практически не зависит от условий окружающей среды, и анализ занимает несколько дней [2]. И хотя существенным препятствием для использования изоферментов, по сравнению, например, с ДНК-маркерами, является их ограниченное количество, изоферментные маркеры остаются востребованными для определения генетической чистоты коммерческих партий линий и гибридов подсолнечника. Этот метод успешно применяется для анализа генетической чистоты гибридных семян у ряда культур, например, у кукурузы [3], капусты [4; 5], риса [6]. Nicolic et al. [7], оценивая генетическую чистоту линий и гибридов подсолнечника методами анализа изоферментов и запасного белка гелиантинина, пришли к выводу, что оба метода достоверны и сопоставимы друг с другом.

В лаборатории иммунитета и молекулярного маркирования ВНИИМК на протяжении двух десятилетий методом анализа изоферментов проводится оценка генетической чистоты самоопыленных линий с участков размножения и гибридов F<sub>1</sub> с участков гибридизации. Оцениваются как простые, так и трехлинейные гибриды [1; 8]. В течение этого времени выявились некоторые особенности, которые возникают в процессе определения генетической чистоты. Целью данной работы является характеристика этих особенностей определения генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника методом изоферментного анализа.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили партии семян самоопыленных родительских линий и гибридов первого поколения подсолнечника селекции ВНИИМК.

Изоферменты экстрагировали гомогенизацией части семядоли сухой семянки в 20 мкл 0,1 М трис-НСI буфера с добавлением 0,1 % поливинилпирролидона. Электрофорез выполняли в 12 %-ном крахмальном геле с добавлением 2 % сахарозы. Для электрофоретического разделения изоферментов использовали две

буферные системы, составленные по методикам, предложенным Cardy et al. [9]. После электрофореза гелевая пластина разрезалась тонкой нихромовой нитью на 5–6 срезов. Выявление зон энзиматической активности проводилось окрашиванием по стандартным прописям Vallejos [10]. Генетическую чистоту линий и гибридов оценивали методом анализа пяти изоферментных систем с примерно равной частотой встречаемости аллозимных вариантов: эстераза (EST), малатдегидрогеназа (MDH), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6PGD), глюкозофосфатизомераза (GPI), глутаматдегидрогеназа (GDH), описанных в работе Туркав с соавторами [8]. Фракции изоферментов обозначены как: SS – аллозим с наиболее медленной электрофоретической подвижностью, FF – аллозим с быстрой электрофоретической подвижностью, vFvF – аллозим с наибольшей электрофоретической подвижностью. Гетерозиготные спектры обозначались соответственно обозначениям аллозимов, их составляющим.

Для анализа использовалась выборка из трёх повторностей по 100–200 семян каждой анализируемой партии.

**Результаты и обсуждение.** Первым и необходимым этапом для оценки генетической чистоты линий и гибридов является их паспортизация по изоферментным маркерам. По биохимическому паспорту проводится оценка генетической чистоты коммерческих партий семян инбредных линий и гибридов. Использование выборки из анализируемой партии в 100–200 семян позволяет оценивать генетическую чистоту партии с точностью до 5 % допущения ошибочных заключений. Приближение к уровню 1 %-ной вероятности допущения ошибочных заключений ведет к увеличению выборки из партии семян, а следовательно, к большей затрате времени и средств, что экономически нецелесообразно [11]. Генетически чистыми считаются семена, имеющие типичный спектр по всем ферментным системам. Типичным для определенного генотипа является растение, обладающее составом изоферментов, являющихся нормой для исследуемого образца.

При определении генетической чистоты у партий семян линий и гибридов обнаруживаются определенные особенности. Так, у гибридов уровень гибридности определяется по тем локусам, которые находятся в гетерозиготном состоянии. Наличие у семян в F<sub>1</sub> отцовского и материнского аллозимных вариантов рассматривается как доказательство гибридности этих семян (рис. 1).

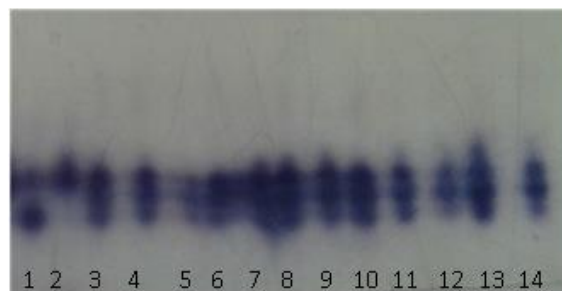


Рисунок 1 – Электрофоретические спектры глюкозофосфатизомеразы (GPI) простого гибрида подсолнечника, гетерозиготного по локусу *Gpi*, и его родительских линий.

Расположение на дорожках:

- 1 – материнская форма гибрида с фенотипом GPI – SS;
- 2 – отцовская форма гибрида с фенотипом GPI – FF;
- 3–14 – гибрид с фенотипом GPI – FS

Для определения генетической чистоты гибрида также используются и гены, находящиеся в гомозиготном состоянии, поскольку при биологическом и механическом засорении гибрида изменяется спектр любого изофермента. В таблице 1 приведены изоферментные фенотипы некоторых простых гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК по пяти системам.

Таблица 1

**Изоферментные фенотипы простых гибридов подсолнечника**

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015 г.

Гибрид	Изоферментный фенотип				
	EST	MDH	GPI	PGD	GDH
Гермес	FF	FS	FS	FS	FS
Фактор	FS	FS	FS	FF	SS
Арсенал	FvF	FS	FS	FF	SS
Триумф	FS	SS	FF	FS	FS
Факел	FS	FS	FF	SS	FF
Имидж	FF	SS	FF	SS	SS
Окси	SS	SS	FF	SS	SS

Как видно из таблицы 1, уровень гибридности у гибрида Гермес можно определять по четырем гетерозиготным изоферментным системам, гибридов Фактор, Арсенал, Триумф – по трем, Факел – по двум. У гибридов Имидж и Окси нет изоферментных локусов в гетерозиготном состоянии. Следовательно, выявить засорение гибрида родительскими линиями по изоферментным локусам невозможно, а возможно определение генетической чистоты гибрида.

Кроме биологического и механического засорения, в случае, если родительские линии гибрида имеют контрастные аллозимные варианты, метод анализа изоферментов позволяет выявлять и самоопыленные растения, т.к. они имеют материнский тип спектра.

Несколько сложнее оценивать генетическую чистоту трехлинейных гибридов. Если одна из родительских форм находится в гетерозиготном состоянии по какому-либо из признаков, то в F<sub>1</sub> мы наблюдаем по этому признаку расщепление по типу анализирующего (рис. 2).

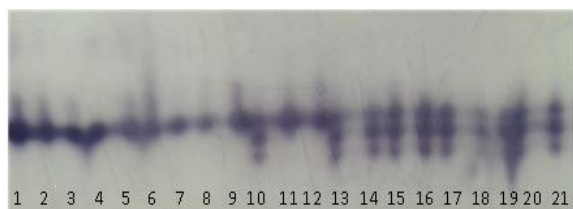


Рисунок 2 – Электрофоретические спектры глюкозофосфатизомеразы (GPI) трехлинейного гибрида подсолнечника.

Расположение на дорожках:  
1–9, 11, 12 – образцы гибрида с фенотипом GPI – FF;  
10, 13–21 – образцы гибрида с фенотипом GPI – FS

В таком случае генетическая чистота гибрида определяется с помощью тех изоферментных локусов, которые находятся в гомо- или гетерозиготном состоянии. Однако количество анализируемых маркерных систем уменьшается, что ведет к снижению точности оценки генетической чистоты. В таблице 2 приведены изоферментные фенотипы некоторых трехли-

нейных гибридов подсолнечника селекции ВНИИМК по пяти системам.

Таблица 2

**Изоферментные фенотипы четырех трехлинейных гибридов подсолнечника**

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015 г.

Гибрид	Изоферментный фенотип				
	EST	MDH	GPI	PGD	GDH
Меркурий	1vFS:1FF	1FS:1FF	1FS:1FF	SS	FF
Альтаир	1vFS:1SS	1FS:1SS	1FS:1FF	FS	FS
Авангард	1FS:1SS	1FS:1SS	FF	FS	1FS:1SS
Кубанский 930	1FvF:1FS	1FS:1SS	1FS:1FF	FS	FS

В таблице 2 показано, что у гибрида Меркурий расщепление на два фенотипических класса по типу анализирующего наблюдается по трем изоферментным системам: EST, MDH, GPI. Два локуса, контролирующей экспрессию изоферментов PGD и GDH, находятся в гомозиготном состоянии, что не даёт возможности установить уровень гибридности, а позволяет выявить только наличие перекрестного опыления чужеродной пыльцой или механической примеси. У гибридов Альтаир и Кубанский 930 расщепление наблюдается по тем же изоферментам. Но локусы *Pgd* и *Gdh*, контролирующей активность изоферментов PGD и GDH, находятся в гетерозиготном состоянии, что позволяет установить уровень гибридности. У гибрида Авангард расщепление наблюдается по изоферментным системам EST, MDH, GDH и информативным является лишь изофермент PGD, находящийся в гетерозиготном состоянии.

Особенности определения генетической чистоты существуют и у самоопыленных родительских линий. Исследования, проведенные Бочковым и соавторами [1], показали, что оценка генетической чистоты семян родительских форм методом анализа спектра изоферментов в большинстве случаев совпадает со стандартом – полевым грунт-контролем. Получаемые в отдельных случаях заниженные показатели типичности при оценке методом изоферментов были объяснены как возможной неоднородностью линий по составу изоферментов, так и относительно небольшой выборкой при проведении анализа. Теоретически родительские ли-

нии гибрида должны быть гомозиготны по всем признакам, но на практике иногда наблюдается несоответствие этому положению. Для выяснения соответствия групп растений, отобранных как типичные и нетипичные для определенных линий методом анализа изоферментов, этим же группам растений при их оценке в поле нами был проведен следующий опыт. Выполняли анализ изоферментов в 100 семянках линии ВК 678, взятых из партии семян с участка размножения. Определение изоферментов проводили в отрезанных частях сухих семядолей. Оставшиеся части семян с зародышами высевали в поле для оценки типичности растений по морфологическим признакам. При анализе семян линии ВК 678 методом электрофореза были обнаружены образцы, имеющие типичные и нетипичные спектры изоферментов. Нетипичными в данном случае считали образцы, отличающиеся от типичных по двум или более изоферментам. К отдельной группе мы отнесли образцы, отличающиеся от типичных лишь по одному изоферменту (табл. 3).

Таблица 3

**Оценка типичности растений линии ВК 678 методами электрофореза изоферментов и полевым**

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015 г.

Характеристика семян по изоферментам	Количество проанализированных семян, шт.	Распределение растений по фенотипу, шт. / %	
		типичные	нетипичные
Типичные	90	90/100	0/0
Нетипичные	3	0/0	3/100
Нетипичные по спектру одного фермента	7	4/57	3/43

Как видно из таблицы 3, растения, выделенные как типичные и нетипичные, одинаково идентифицируются обоими методами. Все растения, которые имели нетипичные спектры по двум или более ферментам, отличались от данной линии по морфологическим признакам. Растения, признанные методом электрофореза нетипичными по спектру одного фермента, при оценке в поле были разделены на

две почти равные группы – 57 % типичных и 43 % нетипичных. Это говорит о том, что у селекционных линий может присутствовать внутрилинейная изменчивость признаков, по которым отбор не ведется, и нельзя с достаточной точностью утверждать, что растение, имеющее нетипичный спектр по одному ферменту, принадлежит к селекционно чистому или загрязненному материалу. Гетерогенность линий по изоферментным локусам может вести к занижению показателей типичности самоопыленных родительских линий и, в дальнейшем, к занижению генетической чистоты у гибридов первого поколения подсолнечника. В идеале ожидается, что инбредная линия будет гомозиготна по всем локусам у всех растений партии семян. Но Woods & Thurman еще в 1976 г., тестируя по изоферментным спектрам более 17000 индивидуальных растений брюссельской капусты 67 инбредных линий, участвующих в коммерческом производстве семян в Соединенных Штатах, показали, что из них в среднем 75 % растений гетерозиготны по одному или нескольким локусам [12].

Во избежание подобных несоответствий лабораторных показателей типичности партий семян фактическим, мы рекомендуем при формировании маточников линий коммерческих гибридов проводить анализ изоферментов с целью выбраковки потомств, гетерогенных хотя бы по одной изоферментной системе.

Таким образом, генетическая чистота простых гибридов может оцениваться по всем анализируемым изоферментным локусам, но уровень гибридности определяется лишь по локусам, находящимся в гетерозиготном состоянии. Если одна из родительских форм трехлинейных гибридов находится в гетерозиготном состоянии по какому-либо из изоферментных локусов, то в F<sub>1</sub> по этому признаку наблюдается расщепление по типу анализирующего и генетическая чистота гибрида определяется только с помощью тех изоферментных локусов, которые находятся в гомо- или гетерозиготном состоянии. Это ведет к уменьшению количества ана-

лизируемых маркерных систем и к уменьшению точности оценки генетической чистоты партии семян. Во избежание несоответствий лабораторных показателей типичности партий семян фактическим, рекомендуется при формировании маточников родительских линий коммерческих гибридов проводить анализ изоферментов с целью выбраковки потомств, гетерогенных хотя бы по одной изоферментной системе.

#### Список литературы

1. Бочковой А.Д., Антонова Т.С., Камардин В.А., Арасланова Н.М., Ветер И.И., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А. Эффективность различных методов определения генетической чистоты партий семян самоопыленных линий и гибридов первого поколения подсолнечника // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2014. – Вып. 1 (157–158). – С. 3–7.
2. Arus P. Genetic purity of commercial seed lots // *Isozymes in plant genetics and breeding*. – Part A. Amsterdam: Elsevier. – 1983. – P. 415–423.
3. Smith J.S.C. and Register J.C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective // *Seed Science Research*. – 1998. – Vol. 8. – Is. 2. – P. 285–294.
4. Hunter R.B. and Kannenberg L.W. Isozyme characterization of *Brassica oleracea* L. inbreds and its relationship to single cross hybrid performance // *Canadian Journal of Genetic Cytology*. – 2001. – V. 13. – P. 649–655.
5. Кудрякова Н.В., Гасанова Н.Д., Крючков А.В. Электрофоретический анализ генетической чистоты гибридов F<sub>1</sub> белокочанной капусты // Науч.-тех. бюл. ВНИИ растениевод. – 1990. – № 202. – С. 65–69.
6. Zhuang S. Application of esterase isozyme for identifying the purity of hybrid rice cultivars // *Fujian Journal of Agricultural Sciences*. – 2004. – Vol. 1. – Is. 4. – P. 247–249.
7. Nikolic Z., Vujakovic M., Jevtic A. Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins // *Helia*. – 2008. – V. 31. – No 48. – P. 47–54.
8. Туркав С.З., Лоскутов А.В., Губенко Т.П. Оценка генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника с помощью изоферментных маркеров // Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 1996. – Вып. 117. – С. 33–37.
9. Cardy B.S., Stuber C.W., Goodman M.M. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes for maize (*Zea mays* L.) // *Institute of Statist. Mineograph., North Carolina State Univers.* – 1981. – Series No 1317. – 154 s.
10. Vallejos C.E. Enzyme activity staining // *Isozymes in plant genetics and breeding: Part A*. – Amsterdam: Elsevier. – 1983. – P. 469–516.
11. Туркав С.З. Генетика изоферментов в селекции гибридного подсолнечника: автореф. дис. ... к.б.н. – СПб., 1995. – 16 с.
12. Woods S. and Thurman D.A. The use of seed acid phosphatases in the determination of the purity of F<sub>1</sub> hybrid Brussels sprout seed // *Euphytica*. – 1976. – V. 25. – P. 702–712.

#### References

1. Bochkovoy A.D., Antonova T.S., Kamardin V.A., Araslanova N.M., Veter I.I., Guchetl' S.Z., Chelyustnikova T.A. Effektivnost' razlichnykh metodov opredeleniya geneticheskoy chistoty partiy semyan samoopylennykh liniy i gibridov pervogo pokoleniya podsolnechnika // *Maslichnye kul'tury*. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2014. – Vyp. 1 (157–158). – S. 3–7.
2. Arus P. Genetic purity of commercial seed lots // *Isozymes in plant genetics and breeding*. – Part A. Amsterdam: Elsevier. – 1983. – P. 415–423.
3. Smith J.S.C. and Register J.C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective // *Seed Science Research*. – 1998. – Vol. 8. – Is. 2. – P. 285–294.
4. Hunter R.B. and Kannenberg L.W. Isozyme characterization of *Brassica oleracea* L. inbreds and its relationship to single cross hybrid performance // *Canadian Journal of Genetic Cytology*. – 2001. – V. 13. – P. 649–655.
5. Kudryakova N.V., Gasanova N.D., Kryuchkov A.V. Elektroforeticheskiy analiz geneticheskoy chistoty gibridov F<sub>1</sub> belokochannoy kapusty // *Nauch.-tekh. byul. VNIИ rastenievod*. – 1990. – № 202. – S. 65–69.
6. Zhuang S. Application of esterase isozyme for identifying the purity of hybrid rice cultivars // *Fujian Journal of Agricultural Sciences*. – 2004. – Vol. 1. – Is. 4. – R. 247–249.
7. Nikolic Z., Vujakovic M., Jevtic A. Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins // *Helia*. – 2008. – V. 31. – No 48. – P. 47–54.
8. Turkav S.Z., Loskutov A.V., Gubenko T.P. Otsenka geneticheskoy chistoty liniy i gibridov podsolnechnika s pomoshch'yu izofermentnykh markerov // *Nauch.-tekh. byul. VNIIMK*. – 1996. – Vyp. 117. – S. 33–37.
9. Cardy B.S., Stuber C.W., Goodman M.M. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes for maize (*Zea mays* L.) // *Institute of Statist. Mineograph., North Carolina State Univers.* – 1981. – Series No 1317. – 154 s.
10. Vallejos C.E. Enzyme activity staining // *Isozymes in plant genetics and breeding: Part A*. – Amsterdam: Elsevier. – 1983. – P. 469–516.
11. Turkav S.Z. Genetika izofermentov v selektsii gibridnogo podsolnechnika: avtoref. dis. ... k.b.n. – SPb., 1995. – 16 s.
12. Woods S. and Thurman D.A. The use of seed acid phosphatases in the determination of the purity of F<sub>1</sub> hybrid Brussels sprout seed // *Euphytica*. – 1976. – V. 25. – P. 702–712.