

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО СПЕКТРА ЗЕИНА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ГЕТЕРОЗИСА У КУКУРУЗЫ**

**В. В. Сидорова, А. В. Конарев, Г. В. Матвеева, Г. И. Тимофеева**

*ГНЦ РФ ВИР им. Н.И.Вавилова* [a.konarev@vir.nw.ru](mailto:a.konarev@vir.nw.ru)

Метод электрофореза запасного белка семян кукурузы – зеина использован для анализа более 200 линий, сортов и гибридов кукурузы из коллекции ВИР им. Н.И.Вавилова, а также селекционных учреждений России, Украины и Молдавии. Подтверждено, что метод электрофореза зеина позволяет идентифицировать и регистрировать инбредные линии и сорта кукурузы, осуществлять контроль за однородностью (гомозиготностью) линий и степенью гибридности. Многолетние исследования проведенные в ВИРе показали, что область применения электрофореза зеина – гораздо шире. Это и формирование желаемого генотипического состава с использованием молекулярных маркеров, и подбор исходных родительских форм при гибридизации. Приведенные в данной статье результаты демонстрируют возможности белковых маркеров в повышении эффективности гибридной (гетерозисной) селекции и будут способствовать оптимальному подбору исходных родительских форм (линий, простых гибридов и т.д.) для достижения высокого эффекта гетерозиса.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Успехи в создании гетерозисных гибридов в значительной мере определяются правильным подбором исходного материала для скрещиваний – самоопыленных (инбредных) линий. Высокогетерозисные гибриды кукурузы, как правило, получаются от скрещивания генетически разнокачественных инбредных линий. Отмечено, что для получения гетерозисного эффекта генетические различия между родительскими формами могут иметь даже большее значение, чем комбинационная способность [10, 11]. В ряде стран значительные усилия были потрачены на получение гибридов кремнистой и зубовидной кукурузы. В Европе селекционеры создавали линии кремнистого подвида кукурузы, а в США и Канаде – зубовидного. Некоторые гибриды созданные на основе этих линий имели высокую степень гетерозиса. Инбредные линии кремнистого подвида кукурузы вносят в гибриды такие ценные качественные признаки, как раннее и дружное созревание, хорошую всхожесть и мощность проростков при пониженных температурах. Родительские формы зубовидной кукурузы придают гибриднему потомству высокую урожайность, устойчивость к болезням и полеганию растений.

Поскольку кремнистый и зубовидный подвиды кукурузы имеют различный генетический потенциал (генный пул), их можно использовать при создании высокоурожайных гетерозисных гибридов. Лучшие двойные гибриды получены скрещиванием инбредных линий,

выведенных из разных сортов. Например, четыре родительские линии гибрида US. 13 (Ну × L 317) (WF 9 × 38-11), имеющего высокую урожайность, получены в селекционных программах различных штатов [10]. Линия Ну получена из сорта Иллинойская высокоурожайная. Линия L 317 получена из сорта Lancaster Schar Crop из Пенсильвании. Линии WF 9 и 38-11 созданы на опытной станции Пардью на основе сорта Reid's Yellow Dent.

На Кубанской опытной станции был создан гибрид ВІР 338 (WF 9 × 38-11) (L 317 × Oh 7), адаптированный к местным условиям. Три линии, использованные для его создания, соответствовали линиям гибрида US. 13. Линию Ну, заменили – на Oh 7, созданную на Иллинойской опытной станции. Простые гибриды были переставлены местами. При такой схеме гибридной селекции, очень важно иметь хотя бы одну линию с инородной зародышевой плазмой. В данном случае линия 38-11 относится к кремнистому подвиду, а остальные – к зубовидному.

В селекции кукурузы до настоящего времени анализ популяций, сортов, линий и гибридов осуществлялся в основном по морфологическим признакам. Подавляющая часть генетических различий при этом не выявляется [5, 6]. Поиск удачных гетерозисных гибридных комбинаций кукурузы проводится преимущественно путем скрещивания огромного количества инбредных линий между собой или известных простых гибридов с модифицированными устаревшими инбредными линиями. Большинство селекционеров в скрещиваниях используют один и тот же набор исходных родительских форм. Это, как правило, приводит к обеднению генетического пула используемого селекционного материала и может, например, вызвать вспышки болезней на посевах кукурузы.

Решительный сдвиг на пути к раскрытию генетической гетерогенности в морфологически однородных популяциях произошел благодаря появлению методов молекулярного анализа, основанных на белковых и ДНК-маркерных системах [3-9, 12]. Эти методы, особенно основанные на применении электрофореза белков, позволяют с большей полнотой и надежностью выявлять полиморфизм популяций, идентифицировать и регистрировать биотипы (генотипы), определять их соотношение в популяциях и т.п. [1, 3-9, 12, 14, 15]. В селекции и семеноводстве кукурузы особенно актуальны проблемы идентификации и маркирования инбредных линий, контроль их генетической чистоты (однородности) и оценка семян межлинейных гибридов на уровень гибридности. Среди различных методов и маркерных систем наиболее удобными и надежными для решения этих проблем оказались электрофорез и изоэлектрическое фокусирование генетически полиморфного запасного белка семян кукурузы – зеина [3, 6, 9, 12]. Анализ полиморфизма зеина положен в основу международных и отечественных стандартных методов идентификации линий и сортов, а также оценки степени гетерозиса кукурузы [4, 8, 15]. Электрофоретический анализ или изоэлектрическое

фокусирование зеина позволяет оценивать инбредные линии на генетическую неоднородность. У генетически чистой линии все зерна выборки (50-100 семян) дают одинаковый спектр. По компонентному составу спектров зеина можно с большой долей вероятности говорить о степени генетического родства тех или иных линий между собой [5, 9, 12].

В нашем институте Т. И. Пеновой на основании результатов изучения большого числа линий и сортов ржи сделано заключение, что сведения о составе и встречаемости спектров и компонентов проламина линий и сортов ржи можно использовать при подборе пар для скрещивания, анализе их комбинационной способности и для прогнозирования возможного гетерозисного эффекта. Ранее связь эффекта гетерозиса с числом специфических компонентов проламина у родительских линий была показана нами для сорго [16].

В задачу настоящей работы входило выяснение связи между компонентным составом зеина родительских линий кукурузы и эффектом гетерозиса. Это в первую очередь необходимо для повышения надежности предсказания эффекта гетерозиса и, соответственно, подбора родительских линий для гибридизации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для данных исследований, проводившихся в течение более 20 лет, послужили 9 сортов и около 200 линий кукурузы из коллекции ВИР им Н.И.Вавилова, а также селекционных учреждений России, Украины и Молдавии [3, 9].

Электрофорез зеина – запасного белка зерна кукурузы проводили в вертикальных пластинах ПААГ по стандартной методике [4, 8, 9]. Гелевая пластина содержит 10% акриламида и 8 М мочевины. В раствор для экстракции зеина входит 6 М мочевина и 0,01 М дитиотрейтол. Электрофорез проводится без охлаждения в течение 5 ч при напряжении 500-580 В.

Электрофоретический спектр зеина содержит от 12 до 22 основных компонентов. При регистрации их записывают в величинах электрофоретической подвижности ( $rf$ ) [3, 4]. Положения основных компонентов зеина изученных нами инбредных линий находятся в пределах  $rf$  36-86. Для оценки интенсивности компонентов использована трехбалльная шкала [4, 9]. На рис. представлены суммарный (эталонный) спектр электрофоретических компонентов зеина, пример спектра инбредной линии и записи ее спектра в виде формулы зеина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Характеристика линий и сортов кукурузы по спектрам зеина.** Нами был изучен компонентный состав спектров зеина большого числа линий, использованных при создании наиболее известных высокогетерозисных гибридов кукурузы. В исследования были взяты линии подвидов кремнистой, зубовидной и полузубовидной кукурузы. Нами установлено, что оцениваемые линии имели очень разные типы спектров. Одновременно была установлена идентичность (или близость) спектров зеина сестринских линий кукурузы [8, 9].

В электрофоретических спектрах зеина были идентифицированы основные (или маркерные) компоненты, по которым в дальнейшем проводился сравнительный анализ инбредных линий, сортов и гибридов кукурузы [9].

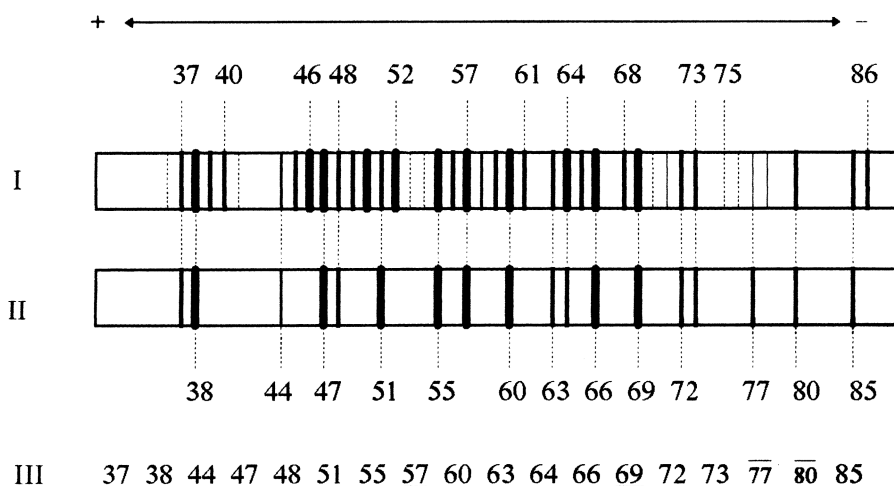


Рис. Номенклатура электрофоретического (ЭФ) спектра зеина и запись зеиновой формулы инбредной линии кукурузы. I – эталонный ЭФ спектр, II – спектр инбредной линии F 2, III – запись линии F 2 по ЭФ эталону

Выяснено, что отдельные компоненты в белковых спектрах могут быть сцеплены между собой и представляют «маркерные комбинации», состоящие из 2-3 компонентов. Отдельные компоненты таких блоков могут служить в качестве самостоятельных маркеров.

Все изученные линии по маркерным компонентам мы разделили на две основные группы. В первую вошли линии с маркерной комбинацией 38-57 (т. е. с компонентами 38 и 57) и отдельными компонентами 47 и 48. Во вторую – линии без компонента 57, но с комбинацией таковых 36-39-40 (за исключением некоторых линий с компонентом 38) и отдельными

компонентами 45 и 46. Внутри каждой основной группы линии распределили на более мелкие группы по комбинациям маркерных компонентов: 52-66-67 и 64-69, а также по различному сочетанию отдельных компонентов – 63-64, 63-65, 63-66, 63-67, 63-64-66, 63-65-66, только 63 и (в редких случаях) – отсутствие компонентов в этой зоне. Некоторые линии имели индивидуальные особенности в составе компонентов с подвижностью от 45 до 51 (табл. 1).

В табл. 1 представлены линии кукурузы наиболее часто используемые при создании гибридов (по одной от каждого подвида). Состав белковых спектров в таблице дан сокращенно в виде значимых для всех групп линий маркерных компонентов. Зону компонентов с подвижностью от 70 до 86 при обсуждении результатов мы не учитывали, так как она содержит мало информации для решения поставленных задач. Компонентный состав зеина линий, не включенных в табл. 1 можно найти в каталоге белковых формул [6]. Распределение линий по группам маркерных компонентов дано в табл. 2.

При сравнении двух основных групп линий установлено, что в первую – с комбинацией 38-57, вошли почти все изученные линии кремнистого подвида и много линий зубовидного подвида кукурузы (табл. 1, 2, гр. I-VIII). В другую группу (без компонента 57) вошли в основном линии зубовидной кукурузы и несколько линий кремнистой кукурузы (табл. 1, 2, гр. IX-XVIII). Соответственно, в сортах кремнистой кукурузы встречаемость типов спектров с комбинацией 38-57 наибольшая: в сорте Gloria Janetzis – 100%, Schindelmeiser – 98%, Старинская местная – 81% и Кремнистая 880Т – 52%. Здесь и далее, данные по сортам приведены из каталога белковых формул [6].

Второй, специфичной для спектров некоторых линий кремнистой кукурузы, является комбинация компонентов 64-69. За редким исключением она встречается в спектрах линий зубовидной кукурузы (табл. 1, 2, гр. VIII). Проанализировав типы спектров, встречающиеся у сорта кремнистой кукурузы Кремнистая 880Т [3], мы обнаружили, что комбинация компонентов 64-69 присутствует в 57% спектров этого сорта. В других сортах кремнистой кукурузы, она встречается реже (17% - Gloria Janetzis и 4% - Schindelmeiser).

У некоторых линий вместо комбинации компонентов 64-69 присутствует таковая 63-64 или 63-64-66. У линий кремнистой кукурузы им сопутствует комбинация компонентов 46-47, а у линий зубовидной кукурузы – 47 или 47-48 (табл. 1, 2, гр. II). То же самое мы наблюдали, когда в зоне компонентов от 63 до 69 встречается только компонент 63. У линий кремнистой кукурузы ему сопутствуют компоненты 46 или 46-47, а у линий зубовидной – 47 или 48 (табл. 1, 2, гр. III). У сортов такой закономерности выявлено не было. Например, у сорта зубовидной кукурузы Sterling White комбинация компонентов 63-64 встречается у 81% спектров (с маркером 57), и только 29% из них имеют компоненты 47 и 48, у остальных – 45 и 46. У сорта зубовидной кукурузы Reid's Yellow Dent выявлено

**Таблица 1.** Характеристика инбредных линий кукурузы по маркерным компонентам зеина

Группы линий по типу спектра	Название линий	Маркерные компоненты зеина															
		37	38	40	45	46	47	48	51	52	57	63	64	65	66	67	69
I	F2 кр.	2	3	–	–	–	3	3	3	–	3	3	2	–	2	–	3
	Сг 25 зуб.	3	3	1	–	–	2	–	3	–	3	1	2	–	–	1	3
II	СМ 7 кр.	3	3	–	–	2	2	–	–	–	3	2	2	–	1	–	–
	W 401 зуб.	3	3	1	–	–	2	2	–	–	3	2	3	–	1	–	–
III	T 22 кр.	3	3	3	–	3	3	–	–	–	3	2	–	–	–	1	–
	T 135 кр.	2	3	3	–	2	2	–	–	–	3	3	–	3	–	–	–
	MV 4 п/з.	3	3	–	–	–	3	–	–	–	3	2	–	–	–	1	–
	P 346 зуб.	3	3	–	–	–	–	3	–	–	3	2	–	1	–	1	–
IV	F 7 кр.	2	3	2	–	–	3	–	–	–	3	2	–	–	–	2	–
V	S 72 зуб.	3	3	1	–	–	–	1	–	–	3	–	–	–	–	1	–
VI	Oh 45 п/з.	–	3	2	–	–	2	3	–	3	3	2	3	–	2	3	–
	A 619 зуб.	–	3	3	–	–	2	3	–	3	3	2	–	–	2	3	–
VII	A 344 зуб.	2	3	2	–	–	3	–	2	–	3	2	–	–	2	–	–
VIII	P 343 зуб.	–	–	2	–	–	3	3	–	–	3	2	2	–	–	–	–
IX	F 522 кр.	–	–	3	3	2	–	–	–	–	–	2	1	–	–	–	2
	N 30 зуб.	1	–	2	3	3	–	–	2	–	–	2	3	–	–	–	3
X	Сг 2 кр.	–	–	2	3	3	–	1	2	–	–	–	2	–	2	–	–
	A 357 зуб.	2	–	1	3	1	–	–	–	–	–	2	2	–	1	–	–
XI	CO 125 кр.	–	–	3	3	3	–	–	–	–	–	2	3	–	–	–	–
	552 зуб.	–	–	2	3	3	–	–	–	–	–	1	2	–	–	–	–
XII	D-Be42 кр.	–	–	1	3	3	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–
	L зуб.	–	–	2	3	2	–	–	1	–	–	2	–	–	–	–	–
XIII	W 64 зуб.	–	–	1	3	3	–	–	–	–	–	3	–	2	–	–	–
XIV	Oс 659 п/з.	2	–	2	2	3	–	–	–	3	–	2	–	–	–	3	–

	Oh 40 зуб.	–	–	3	<b>3</b>	<b>3</b>	–	–	–	<b>3</b>	–	2	3	–	–	<b>3</b>	–
XV	Mo 17 зуб.	–	–	3	<b>3</b>	<b>3</b>	–	–	–	–	–	2	–	–	<b>3</b>	–	–
XVI	B 59 зуб.	–	–	2	<b>3</b>	<b>2</b>	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
XVII	Од 301 кр.	<b>1</b>	<b>3</b>	1	<b>2</b>	–	2	–	–	–	–	2	–	–	<b>2</b>	–	–
	P 502 зуб.	–	<b>3</b>	–	<b>2</b>	–	–	1	–	–	–	1	–	–	<b>2</b>	–	–
XVIII	38-11 кр.	<b>2</b>	–	1	–	<b>3</b>	<b>3</b>	–	–	–	–	2	–	–	3	–	–
	B 76 зуб.	–	–	3	–	<b>3</b>	<b>2</b>	–	–	–	–	3	–	–	–	1	–

**Примечание.** – - отсутствие компонента; жирным шрифтом выделены значимые маркеры. Зуб.- подвид зубовидной, п/з – полужубовидный и кр. – кремнистой кукурузы.

27% спектров с комбинацией компонентов 63-64, и только 7% имеют компоненты 47 и 48, у остальных – 45 и 46. В изученных нами сортах кремнистой и зубовидной кукурузы спектры с единственным компонентом 63 в зоне с подвижностью компонентов от 63 до 69 встречаются редко.

Таблица 2. Распределение линий по группам спектров зеина с разными маркерами

Группы линий по типу спектра	Названия инбредных линий кукурузы	Подвид кукурузы
I	HMV 2-75, BC 10224, MA 21, BC 2928/2, EP 1, <b>F 2</b> , 205. <b>Cr 25</b> , 138-M-1	Кремнистая Зубовидная
II	<b>CM 7</b> , LP 1349, MK 195 RA 188, <b>W 401</b> , H 5, CO 106, л. 106, Од 102, Кр 752, A 96, W 153 R	Кремнистая Зубовидная
III	FC 18, <b>T 22</b> , T 23, 4 Y, EE / M, Oc 44 A, <b>T 135</b> BC 252, BC 258, J 123, <b>MV 4</b> TVA 1086, ES 51 A, RF 7, A 385, <b>P 346</b> , 40-61 F	Кремнистая Полужубовидная Зубовидная
IV	380, <b>F 7</b> , F 4	Кремнистая
V	BC 27 D4, SD 26, <b>S 72</b>	Зубовидная
VI	SSmEE/11A, Oc 18 r, <b>Oh 45</b> Дк 66а, Oh 43, 156, <b>A 619</b> , B 55, 24-м-1, B 8, МК03, HMV 1615	Полужубовидная Зубовидная
VII	<b>A 344</b> , МК 01, 111, R 803, C 103, ГФ 2, A 34, OS 420, MC401, C	Зубовидная

	49, WF 9, BU 227, P 354	
VIII	P 101, <b>P 343</b> , P 165, КОСЛ 24, 432, 395, Ну, 3-18	Зубовидная
IX	<b>F 522</b> N 30, N 35, Jtl 701, AD 89	Кремнистая Зубовидная
X	<b>Cr 2</b> , S 2-19-50 092, <b>A 357</b> , УДФ 10, С-22-2, ГК 44	Кремнистая Зубовидная
XI	<b>CO125</b> , Од 112 H 26 MR 18, M 14, RF 109, N 6, C 102, <b>552</b> , A 374, A 375, RF 17	Кремнистая Полузубовидная Зубовидная
XII	<b>D-Be 42</b> , W 15 ЮВ 3 2390 1/28, 2394 1/28, A 171, ЮВ 24, 103, Tva 90, 93-и-4, <b>L</b> , 149, Oh 7	Кремнистая Полузубовидная Зубовидная
XIII	B 40, Ce 5, <b>W 64</b> , N 22, W 187-2-1	Зубовидная
XIV	<b>Oc 659</b> B 37, <b>Oh 40</b> , N 25, AS 7, Fk 4	Полузубовидная Зубовидная
XV	Харьк. 44, Харьк. 46, HNV 1352, МК 167, Г 23, <b>Mo 17</b> , 128-М-5, E 12, 315, Кр 710, R 161, B 73, 673	Зубовидная
XVI	A 632, <b>B 59</b> , B 14A, A 293-3-2	Зубовидная
XVII	<b>Од 301</b> Fk 51, ОК 104, МК 159 V 158, <b>P 502</b> , L 317, CG 10, С-28-27, 347	Кремнистая Полузубовидная Зубовидная
XVIII	BC 2940, <b>38-11</b> A 334, <b>B 76</b> , B 2, 131-И-5	Кремнистая Зубовидная

**Примечание.** Жирным шрифтом выделены названия линий, приведенных в табл. 1.

Сочетание компонента 63 с интенсивным компонентом 67 встречается только в спектрах линий кремнистой кукурузы (табл. 1, 2, гр. IV). Соответственно, в сорте кремнистой кукурузы Gloria Janetzis сочетание компонентов 63-67 можно встретить у 83% спектров. У линий зубовидной кукурузы маркерный компонент 67 проявляется очень слабо.

Линии без компонента 63 встречаются редко, только у зубовидного подвида кукурузы (табл. 1, 2, гр. V).

В спектрах линий подвида кремнистой кукурузы очень редко встречается комбинация компонентов 52-66-67. Она соответственно отсутствует в спектрах сортов кремнистой кукурузы



(Кремнистая 880Т, Schindelmeiser и Gloria Janetzis). Среди линий зубовидной кукурузы эта комбинация встречается довольно часто (табл. 1, 2, гр. VI). Соответственно в спектрах сорта зубовидной кукурузы Lancaster Schar Crop, комбинация компонентов 52-66-67 выявлена во всех спектрах, имеющих маркерный компонент 57, и составляет 74%.

Линии, в спектрах которых встречается сочетание компонентов 63-66, относятся только к подвиду зубовидной кукурузы (табл. 1, 2, гр. VII). В тоже время сорт кремнистой кукурузы Старинская местная имеет 56% спектров с такими маркерами.

Среди линий, имеющих в спектрах маркерный компонент 57, выделяется малочисленная группа, в спектрах которой вместо комбинации 38-57 присутствует таковая 39-40-57 (табл. 1, 2, гр. VIII).

Рассмотрим вторую основную группу линий, в спектрах которой нет компонента 57, но присутствуют комбинации таковых: 36-39-40 или 39-40. Им, как правило, сопутствуют компоненты 45-46 или 46. В эту группу входит большая часть линий зубовидной кукурузы и несколько линий кремнистой кукурузы.

В сорте зубовидной кукурузы Funk's Crug Corn обнаружено 100% спектров без маркерной комбинации 38-57. В других сортах зубовидной кукурузы количество спектров без компонента 57 составляет: 35% у Reid's Yellow Dent, 26% у Lancaster Schar Crop и 19% – Sterling White. В сортах кремнистой кукурузы количество таких спектров еще меньше и составляет 19% у Старинской местной, 3% у Schindelmeiser, а в сорте Gloria Janetzis таких спектров нет.

Несмотря на довольно сходный состав спектров по компонентам с подвижностью от 36 до 40 и от 45 до 50, линии в рассматриваемой группе (как и в первой) четко разделились по различному сочетанию маркерных компонентов в зоне с подвижностью от 63 до 69.

Линий с маркерной комбинацией 64-69 выявлено немного: одна из них F 522 кремнистого подвида (табл. 1, 2, гр. IX). В сорте зубовидной кукурузы Funk's Crug Corn из 100% спектров без маркерной комбинации 38-57 у 96% обнаружены маркерные компоненты 64-69, в сорте Кремнистая 880Т таковых обнаружено 7% из 48% спектров без маркера 57. Линий, имеющих сочетание компонентов 63-64-66 также немного. Две из них – кремнистого подвида (табл. 1, 2, гр. X). Только в сорте зубовидной кукурузы Sterling White из 19% спектров без маркера 57, у 11% встречаются спектры с таким сочетанием компонентов.

Гораздо больше выявлено линий с маркерными компонентами 63-64. Из них только две линии кремнистой кукурузы (табл. 1, 2, гр. XI). Спектры с такими компонентами обнаружены в сортах Reid's Yellow Dent и Sterling White по 7% в каждом (соответственно из 35% и 19% без компонента 57).

Среди линий, в спектрах которых в зоне с подвижностью компонентов от 63 до 69 обнаружен единственный компонент 63, много линий зубовидного подвида и только две кремнистого (табл. 1, 2, гр. XII). Сорт зубовидной кукурузы Reid's Yellow Dent имеет 13% таких спектров (из 35% без маркера 57). В остальных сортах подобные типы спектра не обнаружены.

Сочетание компонентов 63-65 выявлено только у линий зубовидного подвида (табл. 1, 2, гр. XIII). Эти сочетания компонентов обнаружены нами в сортах Reid's Yellow Dent (10%) и Кремнистой 880Т (12%).

Линии с маркерной комбинацией 52-67 относятся в основном к зубовидному подвиду. Исключение – линия Ос 659 полужубовидного подвида (табл. 1, 2, гр. XIV). Сорт зубовидной кукурузы Lancaster Schar Stop имеет 26% спектров с такой комбинацией компонентов, а сорт кремнистой кукурузы Старинская местная – 15%.

В селекционных программах широко используются линии зубовидной кукурузы с компонентами 63-66. Среди них нет линий кремнистой кукурузы с такими маркерами (табл. 1, 2, гр. XV). Подобные типы спектра обнаружены нами только в сорте Старинская местная.

Линии без компонента 63 – только зубовидного подвида. В сортах такие спектры не обнаружены (табл. 1, 2, гр. XVI).

Среди изученных выделяется группа из 10 линий, в спектрах которых обнаружен интенсивный компонент 38. Обычно он сцеплен с маркером 57, но в данном случае «38» выступает как самостоятельный компонент. Ему сопутствует менее интенсивный компонент 45 и группа интенсивных компонентов 48-49-50 (табл. 1, 2, гр. XVII). Можно предположить, что эти линии сестринские. Хотя они имеют разное название и созданы в разных странах, они, видимо, созданы на основе классической линии Р 502. Также выделяется немногочисленная группа линий, в спектрах которых обнаружено сочетание компонентов 56-58 (табл. 1, 2, гр. XVIII). Из них две линии кремнистого подвида. Подобные типы спектров встречаются очень редко в сортах Reid's Yellow Dent и Кремнистая 880Т.

#### **Анализ результатов деятельности селекционеров с использованием спектров зеина.**

Для создания новых инбредных линий селекционеры часто скрещивают их со свободноопыляющимися сортами. Основное условие – подбор генетически разнородного материала. Выбрать сорт, с которым лучше скрестить ту или иную линию можно с помощью молекулярных маркеров.

Так Гаркушка В.Г. на Кубанской опытной станции ВИР (КОС ВИР) на основе гибрида между высоко-полиморфным сортом кремнистой кукурузы Schindelmeiser и линией кремнистого подвида (с маркером 57 и комбинацией компонентов 64-69) создал весьма ценную с высокой комбинационной способностью линию 205 (Табл. 1, 2, гр. I). Скрещиваемые формы

оказались очень разными по спектрам зеина: в сорте Schindelmeiser спектров с комбинацией компонентов 64-69 оказалось всего 4%.

Используя принцип белковых маркеров, можно предположить какая линия и какой сорт при скрещивании дадут высокогетерозисное потомство. Например, для получения сорто-линейного гибрида Харьковский 10 ТВ использовали сорт Старинская местная и линию Харьковская 46. В сорте Старинская местная нами обнаружено 83% генотипов с маркерной комбинацией 52-66 (из них 81% с маркером 57), тогда как в спектрах линии этих компонентов нет (табл. 1, 2, гр. XV). Таким образом, чем больше различий в спектрах скрещиваемого материала по маркерным компонентам, тем большего гетерозисного эффекта можно ожидать от гибридной комбинации.

Известно, что в результате многократных самоопылений у инбредных линий может снизиться устойчивость к болезням, урожайность и др. биологические и хозяйственные показатели. Такие линии требуют своевременного улучшения. В отечественной селекции примером может служить улучшение линий выдающегося гетерозисного гибрида В 73 × Мо 17. После восьмикратного самоопыления гибрида Мо 17СВ × ХМ 552 В. Г. Гаркушка создал из него линию 552СВ, которая существенно отличается по маркерным компонентам от Мо 17СВ (табл. 1, гр. XI и XV). В ее электрофоретическом спектре обнаружен четкий маркерный компонент 64. Улучшенную линию использовали в создании гибрида 673 × 552СВ. Линия 673 – это также улучшенная версия линии В 73 (табл. 1, 2, гр. XV). В спектре линии 673 выявлены интенсивные компоненты 63 и 66. Таким образом, в результате селекционной работы увеличилась разница между двумя «улучшенными линиями» по составу маркерных белков. Маркер 64 от отцовской линии позволяет точно определить процент гибридных семян.

Другими примерами улучшения линий, проведенных на КОС ВИР, является создание линии кукурузы 347 из простого гибрида Р 346 × СГ 10 (девять самоопылений). По основным маркерным компонентам линия 347 оказалась ближе к линии СГ 10 (табл. 1, 2, гр. XVII). В ее спектре нет компонента 57 и хорошо представлены компоненты 38 и 64. От линии Р 346 в спектр новой линии вошли компоненты 37, 49 и 50 (табл. 1, гр. III).

Мы проанализировали типы спектров линий, с использованием которых были получены наиболее ценные гибриды. Линия зубовидной кукурузы А 344 с хорошей комбинационной способностью была использована при создании многих отечественных простых, тройных и двойных гибридов, например, А 344 × Т 22, А 344 × Т 23 и А 344 × Т 135 и др. (табл. 1, гр. VII). В этих гибридах отцовскими формами служили линии кремнистой кукурузы из Болгарии. В линиях Т 22 и Т 23 обнаружены маркеры 63-67, а в линии Т 135 – 63-65 (табл. 1, 2, гр. III; табл. 3).

Таблица 3. Примеры гибридных комбинаций (простые, двойные и тройные гибриды), маркируемых по компонентам зеина

Родительские линии, гибриды	Маркерные компоненты зеина														
	37	38	40	45	46	47	48	51	52	57	64	65	66	67	69
♀ В 40	+	-	+	<b>3</b>	+	-	<b>2</b>	-	-	-	-	<b>2</b>	-	-	-
♂ С 103	+	<b>3</b>	+	-	+	<b>2</b>	-	-	-	<b>3</b>	-	-	<b>2</b>	-	-
Красно- Дарский 201	+	<b>2</b>	+	<b>2</b>	+	<b>1</b>	<i>1</i>	-	-	<b>3</b>	-	<b>2</b>	<b>1</b>	-	-
♀ F 7	+	+	<b>2</b>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
♂ F 2	+	+	-	-	-	+	<b>3</b>	<b>3</b>	-	+	<b>2</b>	-	+	-	<b>3</b>
Дружба	+	+	<b>2</b>	-	-	+	<b>1</b>	<b>2</b>	-	+	<b>2</b>	-	+	-	<b>3</b>
♀ N 6	-	-	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	+	-	-	-	-	<b>2</b>	-	-	-	-
♂ Мс 401	<b>3</b>	<b>3</b>	-	-	-	+	<b>2</b>	<b>1</b>	-	<b>3</b>	-	-	<b>2</b>	-	-
Чуйский 466	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<i>1</i>	<b>2</b>	+	<b>1</b>	<b>1</b>	-	<b>3</b>	<b>2</b>	-	<b>1</b>	-	-
♀ V 158	<b>2</b>	+	-	<b>2</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
♂ В 55	-	+	<b>3</b>	-	-	<b>2</b>	+	-	<b>3</b>	<b>3</b>	-	-	<b>2</b>	<b>3</b>	-
Красно- Дарский 602	<b>2</b>	+	<b>2</b>	<b>2</b>	-	<b>2</b>	+	-	<b>3</b>	<b>3</b>	-	-	<b>1</b>	<b>2</b>	-
♀ А 344 ×	<b>3</b>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Т 135	<b>2</b>	+	+	-	<b>2</b>	+	-	-	-	+	-	<b>3</b>	-	-	-
♂ А 619	-	+	+	-	-	+	<b>3</b>	-	<b>3</b>	+	-	-	+	<b>3</b>	-
Днепровский 460	<b>2</b>	+	+	-	<b>2</b>	+	<b>2</b>	-	<b>2</b>	+	-	<i>1</i>	+	<b>2</b>	-
♀ WF 9 ×	-	<b>3</b>	-	-	-	-	<b>3</b>	-	-	<b>3</b>	-	-	-	-	-
N 6	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<b>2</b>	-	-	-	-
♂ L ×	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
В 37	-	-	+	+	+	-	-	-	<b>3</b>	-	-	<b>2</b>	-	<b>3</b>	-
Красно- Дарский 236	-	<b>3</b>	+	+	+	+	<b>2</b>	-	<b>2</b>	<b>2</b>	<i>1</i>	<b>2</b>	-	<b>2</b>	-

Примечание. Жирным шрифтом выделены маркерные компоненты гибридности.

Курсивом показаны компоненты характерные только для материнских форм.

Существует мнение, что скрещивание двух линий кукурузы зубовидного подвида для достижения эффекта гетерозиса не целесообразно [10]. Наиболее продуктивные гибриды получаются как правило при скрещивании зубовидных и кремнистых форм. Однако линию А 344 (материнская форма) успешно скрещивали с другими линиями зубовидной кукурузы А 619, W 153R, ГК 44, А 357 и А 334. Таким образом, если родительские линии создаются на основе разных сортов зубовидной кукурузы и существенно отличается друг от друга по наличию маркерных компонентов в спектрах, то в результате получаются гибриды с высоким гетерозисным эффектом. Так выше перечисленные отцовские линии имеют специфичные маркерные комбинации, которые не встречаются в спектрах материнской линии: А 619 – 52-66-67 (маркерные компоненты гибридности 52 и 67); W 153R – 63-64-66 (маркер – 64). Линии ГК 44 и А 357 также имеют комбинацию 63-64-66 (без компонента 57). Отсутствие компонента не может служить показателем гибридности, но вносит отличие в спектры линий от материнского растения, что важно для проявления эффекта гетерозиса (табл. 1, 2, гр. II, IV, IX). Простые гибриды могут быть использованы для получения тройных (А 344 × Т 135) × А 619, (А 344 × W 153R) × МК 159 и двойных гибридов – Пионер 3978 × (А 344 × Т 22), Пионер 3978 × (А 344 × А 619) и (А 344 × А 357) × (Од 301 × WF 9) (табл. 3).

В селекционных программах для улучшения или усиления признаков линий в потомстве часто используют возвратное скрещивание. Например, в гибриде (Р 346 × Р 502) × MV 4 отцовская линия венгерского происхождения по белковым маркерам достаточно близка к линии Р 346, что подтверждают наши данные (табл. 1, гр. III). В отечественных селекционных программах широко используются гибриды американской фирмы Pioneer, например: Пионер 3978 (Р 346М × Р 502зМ). Для получения же производственных гибридов следует использовать отцовские линии не родственные материнским формам, а значит имеющие в своих спектрах иные маркеры. Примером может служить гибрид (Р 346 × Р 502) × А 619, где линия А 619 имеет специфичную маркерную комбинацию 52-66-67 и компонент 40, которые отсутствуют в спектре зеина материнской формы гибрида. Она с успехом может быть заменена линиями из этой же группы В 55 или Oh 43 (табл. 1, 2, гр. VI). Вместо линии А619 можно использовать линии зубовидной кукурузы с другими маркерами, либо контрастные линии кремнистой кукурузы (например, Т22). Отцовской формой может быть также простой гибрид, но он должен иметь в своем составе хотя бы одну линию не родственную материнским. Примеры таких гибридов с участием Пионер 3978 и линии А344 приведены нами выше.

Известно много гибридов селекции КНИИСХ им. П. П. Лукьяненко, в которые вошла линия зубовидной кукурузы W 64 с высокой комбинационной способностью. Она

использовалась в качестве родительской формы в простых ( $W 64 \times Cг 25$ ,  $W 64 \times WF 9$  и  $W 64 \times B 55$ ), трехлинейных и двойных гибридах. Все линии этих гибридов относятся к зубовидному подвиду, но различаются по белковым маркерным компонентам. Так линия  $W 64$  входит в группу, в спектре которой нет компонентов 38 и 57, но имеются компоненты 45, 46 и 65 (табл. 1, гр. XIII). Все отцовские линии в указанных гибридах имеют маркерную комбинацию 38-57 и в каждой из них есть дополнительные маркеры: для  $Cг 25$  – 37 и 64-69, для  $WF 9$  – 48 и 66, для  $B 55$  – 40, 47 и 52-66-67 (табл. 1, 2, гр. I, VI, VII). В тройных гибридах в качестве отцовской формы используют линию зубовидной кукурузы  $V 158$ . Она не имеет маркера 57 (присутствует компонент 38), ее спектр вообще не богат маркерами для определения гибридности, но отсутствие компонента 57 увеличивает разницу белковых спектров родительских форм (табл. 1, 2, гр. XVII). Большое число маркерных компонентов (52-66-67 и 57) для определения степени гибридности обнаружено у линии  $B55$  в гибриде  $V 158 \times B 55$  (табл. 3). Вместо линии  $B55$  может быть взята  $A619$ , либо другая линия, имеющая аналогичные маркеры (табл. 1, 2, гр. VI). Более удачным являлся тройной гибрид ( $W 64 \times WF 9$ )  $\times Cг 25$ , в котором вместо линии  $V 158$  использована линия  $Cг 25$ , имеющая маркеры 37 и 64-69 (табл. 1, гр. I). Хорошее сочетание линий (особенно для определения гибридности семян) использовано в двойном гибриде ( $W 64 \times Cг 25$ ) $\times(E 12 \times T 22)$  (табл. 1, 2, гр. III, XV).

Существует мнение, некоторые линии в «норме» в своем составе могут иметь два-три биотипа. Мы считаем, что уровень гомозиготности линий в большинстве случаев зависит от стиля работы селекционеров, создающих линии. Нами проанализировано несколько таких линий, полученных из разных селекционных учреждений. Среди них идентифицированы линии, имеющие один тип спектра, например:  $Cг 25$  (колхоз им. Фрунзе, 1984),  $W 64$  (КНИИСХ, 1984) и  $A 344$  (КОС ВИР, 1987). Наличие нескольких генотипов у одной и той же линии селекционеры часто связывают с переводом их «на стерильную основу». Мы сравнили спектры фертильной и стерильной формы линии  $W 64$  (КНИИСХ, 1984). Белковые формулы у обеих форм оказались одинаковыми и представленными только одним биотипом. Такой же опыт мы провели с линией  $A 344$ , полученной из разных учреждений. Линия  $A 344$  из КОС ВИР (1987) была однородна по спектрам зеина, а линия  $A 344$  из КНИИСХ (1984), как фертильная, так и стерильная имели по несколько генотипов.

Гомозиготность линии можно контролировать методом электрофореза, который показывает селекционеру, что процесс создания той или иной линии завершен. Есть линии, которым требуется нескольких самоопылений, чтобы достичь гомозиготности, другим – до 9 и больше. Метод электрофореза позволяет судить о завершенности процесса формирования гомозиготности, тем самым ускоряя процесс создания генотипов.

В гибридной селекции часто весьма продуктивными являются гибридные комбинации с участием только линий кремнистой кукурузы. Это известный простой гибрид Дружба ( $F 7 \times F 2$ ), тройные гибриды ( $F 7 \times F 2$ )  $\times$  D-Be 42 и ( $F 7 \times F 2$ )  $\times$  МК 167, а также двойной гибрид [ $(F 7 \times Ma 21) \times F 2$ ]  $\times$  СО 125 (табл. 3). Все родительские формы в перечисленных гибридах – кремнистые, за исключением МК 167. В двойном гибриде линия Ma 21 по маркерным компонентам похожа на линию F 2 (табл. 1, 2, гр. I). В материнском гибриде вероятно проведено возвратное скрещивание, в результате которого потомство приобретает больше признаков характерных для линии F 2. В гибриде Дружба спектр отцовской линии F2 имеет компонент 48 и комбинацию компонентов 64-69, которые отсутствуют в спектре материнской линии F7 и служат маркерами степени гибридности. Линии D-Be 42 и СО 125 резко отличаются от других линий кремнистой кукурузы отсутствием в их спектрах маркерного компонента 57 и наличием компонентов 39, 45 и 46 (табл. 1, 2, гр. XI, XII). Поэтому, очевидно, гибриды от скрещивания их с другими линиями кремнистой кукурузы и показывают высокий эффект гетерозиса.

Часто весьма продуктивными оказываются гибриды, полученные от скрещивания линий с маркером 57 и без него. Эффект гетерозиса выше, когда в спектрах родительских линий есть дополнительные различия по маркерам из зон с другой подвижностью компонентов. Например, в гибриде Чуйский 466 ( $N 6 \times Mc 401$ ), линия Mc 401 имеет маркеры 57 и 66, которых нет в линии N 6. Кроме того, линия N 6 имеет компоненты 40, 45, 46 и 64, которых нет в спектре отцовской линии Mc401 (табл. 1, 2, гр. VII, XI; табл. 3). В другом гибриде – Краснодарский 201 ( $B 40 \times C 103$ ), родительские линии также имеют белковые спектры с различным составом маркерных компонентов. В спектре отцовской линии C 103 выявлены компоненты 57 и 66, которых нет в спектрах материнской линии B 40, а в спектре материнской линии присутствуют компоненты 45 и 65, отсутствующие в спектре отцовской линии (табл. 1, 2, гр. VII, XIII; табл. 3).

Рассмотрим двойной гибрид Краснодарский 236ТВ ( $WF 9T \times N 63T$ )  $\times$  ( $L \times B 37TB$ ). В спектре материнской гибридной формы у линии WF 9T есть компоненты 38 и 57, а у линии N63T – их нет, но есть компоненты 45, 46 и 64. Отцовская гибридная форма в свою очередь не имеет в спектре компонентов 38 и 57, но от линии B 37 приобретает компоненты 52, 65 и 67, которые и являются маркерами для определения гибридности (табл. 1, 2, гр. XIV; табл. 3). Данные по многим другим удачным гибридным комбинациям были представлены нами ранее в каталоге белковых формул [6]. Как выяснилось, большинство из них также получены скрещиванием линий, имеющих очень разные типы спектров (разный состав маркерных компонентов).

В ходе работы по созданию новых гибридов с высоким эффектом гетерозиса селекционеры постоянно улучшают старые и создают новые инбредные линии. Поскольку полиморфизм зеина (как и других запасных белков семян и изоферментов), выявляемый электрофорезом и изоэлектрическим фокусированием, носит адаптивный характер [1, 2, 6, 7, 14, 15], генетические изменения в линиях (сортах, генотипах) сопровождаются соответствующими изменениями в спектрах белка. Это подтверждается также более чем 30-ти летним опытом работы ВИР [2-6, 8, 9], данными других отечественных и зарубежных исследователей [7, 11-15, 17]. Таким образом, метод электрофореза зеина позволяет не только идентифицировать и регистрировать инбредные линии и сорта кукурузы, но и осуществлять контроль за однородностью (гомозиготностью) линий и степенью гибридности.

Как показали многолетние исследования нашей лаборатории сфера применения данного метода – гораздо шире. Сопровождение селекции с использованием молекулярных маркеров (marker assisted selection) – один из важных аспектов их применения. Это и формирование желаемого генотипического состава с использованием молекулярных маркеров, и подбор исходных родительских форм при гибридизации. Приведенные в данной статье результаты демонстрируют возможности белковых маркеров в повышении эффективности гибридной (гетерозисной) селекции. Данные по составу спектров зеина, приведенные в наших публикациях и, особенно в этой работе (табл. 1, 2) будут способствовать оптимальному подбору исходных родительских форм (линий, простых гибридов и т.д.) для достижения высокого эффекта гетерозиса.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях // М. – Наука. – 1988. – 328с.
2. Конарев А.В. Адаптивный характер молекулярного полиморфизма и его использование в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия. 2002. – № 3. – С. 3-13.
3. Конарев В. Г., Сидорова В. В., Тимофеева Г. И. Электрофорез зеина как метод идентификации, регистрации и анализа сортов, линий и гибридов кукурузы // С.-х. биология. – 1990. – № 3. – С. 167-177.
4. Конарев В. Г., Гаврилюк И. П., Губарева Н. К. и др. Идентификация, анализ и регистрация сортов, линий и гибридов кукурузы электрофорезом и изоэлектрофокусированием зеина // Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. – С.-Пб.: РАСХН, ВИР. – 2000. – С. 73-89.



5. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений // Спб., ВИР.– 2001. – 417с.
6. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Теоретические основы селекции // под ред. В.Г.Конарева. Том I. М., Колос. – 1993. – 447с.
7. Нецветаев В.П., Поморцев А.А., Крестников И.С. Распределение аллелей супердиоксидмутазного локуса в культуре ярового ячменя по территории бывшего СССР// Генетика. – 1995.– V. 31, № 12. – С. 1664-1670.
8. Рекомендации по использованию белковых маркеров в сортоиспытании, семеноводстве и семенном контроле // под ред. В.Г.Конарева. Москва-Ленинград, Госагропром СССР, ВИР. – 1989. – 20с.
9. Сидорова В. В., Матвеева Г. В., Тимофеева Г. И. Анализ и регистрация линий, сортов и гибридов кукурузы по зеину методом электрофореза / Методические указания и каталог белковых формул / под ред. В. Г. Конарева – С.-Пб.: РАСХН, ВИР. – 1998. – 50 с.
10. Югенхеймер Р. У. Кукуруза. Улучшение сортов, производство семян, использование. – М.: Колос. – 1979. – 519 с.
11. Шмараев Г. Е. Происхождение самоопыленных линий кукурузы, широко используемых в США // Труды по прикл. бот., ген. и сел. – 1974. – Т. 53. – С. 82-105.
12. Сидорова В. В., Тимофеева Г. И., Конарев В. Г. Идентификация и регистрация сортов, линий и гибридов кукурузы методами электрофореза зеина // Труды по прикл. бот., ген. и сел. – 1987. – Т. 114. – С. 61-75.
13. Allard R.W. Genetic basis of the evolution of the adaptedness in plants. Adaptation in plant Breeding / Ed. P.M.A. – Tigerstedt. 1997. – P. 1-12.
14. Hawtin G., Ivanga M., Hodgkin T. Genetic resources in breeding for adaptation. Adaptation in plant Breeding / Ed. P.M.A. Tigerstedt. – 1997. – P. 277-288.
15. International Rules for Seed Testing. Rules 1996. Verification of species and cultivar // Seed Sci.& Technol. – 1996. – V. 24 (Supplement). – P. 253-270.
16. Konarev A. V., Khomutnikova L. A., Malinovski B. N. The use of electrophoresis of storage proteins in breeding sorghum for heterosis and in marking biotypes of value for breeding // Extended synopsis FAO /IEAE Int. Symp. : The Use of induced Mutations and Molec. Techniques for Crop Improvement. Austria, Vienna. – 1995. – P. 201.
17. Perez de la Vega. Plant genetic adaptedness to climatic and edaphic enviroment. Adaptation in plant Breeding / Ed. P.M.A. Tigerstedt. – 1997. – P. 27-38.

*Сидорова В. В., канд. биол. наук;*

*Конарев А. В., докт. биол. наук, профессор;*

*Матвеева Г. В., канд. биол. наук;*

*Тимофеева Г. И.*

*ГНЦ РФ ВИР им. Н.И.Вавилова*