

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья
УДК 633.152:581.192
DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-160-175



Спектры зеина как эффективные маркеры хозяйственно ценных признаков кукурузы

В. В. Сидорова, А. В. Конарев, Ю. А. Керв

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Юлия Андреевна Керв, kerv@mail.ru

Эффективное использование кукурузы (*Zea mays* L.) в сельском хозяйстве целиком зависит от изученности ее генофонда, который, в свою очередь, нуждается в регистрации и паспортизации по мере поступления новых данных. Кукуруза является одним из модельных объектов применения маркерной методологии. Данная статья обобщает результаты многолетнего изучения генофонда кукурузы в Федеральном исследовательском центре Всероссийском институте генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) по двум основным направлениям: идентификация мирового генетического разнообразия кукурузы (включая наиболее важных для селекционного использования дикорастущих родичей) и поиск надежных белковых (зеиновых) маркеров селекционно ценных признаков для использования в селекции, семеноводстве и семенном контроле этой культуры. На конкретных примерах показана эффективность использования зеиновых маркеров при создании новых и улучшении существующих инбредных линий. На примерах таких хозяйственно ценных признаков, как раннеспелость, взрываемость и восковидность зерна, продемонстрирована возможность контроля с помощью зеиновых маркеров за «включением» этих признаков в селекционный материал. Приведены доказательства эффективности использования зеиновых маркеров при подборе родительских пар для получения высокогетерозисных гибридов. Проведено сравнение принятой в ВИР номенклатуры спектров зеина после разделения его электрофорезом в полиакриламидном геле в кислом буфере (PAGE), с номенклатурой зеина после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), принятой в зарубежном научном сообществе. Исследования проведены на большом объеме образцов из коллекции ВИР, а также на селекционном материале, предоставленном ведущими селекционерами страны.

Ключевые слова: *Zea mays* L., запасные белки кукурузы, белковые маркеры, электрофоретические спектры зеина, номенклатура зеина, α -зеин, β -зеин, γ -зеин, δ -зеин

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № FGEM-2022-0009 «Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Сидорова В.В., Конарев А.В., Керв Ю.А. Спектры зеина как эффективные маркеры хозяйственно ценных признаков кукурузы. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(2):160-175. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-160-175

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-160-175

Zein patterns as effective markers of valuable agronomic traits in maize

Valeriya V. Sidorova, Alexey V. Konarev, Yulia A. Kerv

N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Yulia A. Kerv, kerv@mail.ru

The effective use of maize (*Zea mays* L.) in agriculture depends entirely on the knowledge of its gene pool, which, in turn, needs to undergo registration and certification as new data become available.

Maize is one of the model objects for applying the marker methodology. This article summarizes the results of a long-term study of the maize gene pool at N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) in two main areas: identification of the world genetic diversity of maize (including the most important wild relatives for breeding use), and search for reliable protein (zein) markers of traits valuable for breeding in order to use them in improvement, seed production, and seed control of this crop. Specific examples show the effectiveness of using zein markers in the development of new inbred lines and improvement of the existing ones. On the examples of such agronomic traits as early maturity, explosiveness, and waxiness of maize grain, the possibility of controlling the “inclusion” of these traits in the breeding material with the help of zein markers has been demonstrated. Evidence of the effectiveness of applying zein markers in the selection of parental pairs to obtain highly heterotic hybrids is presented. The nomenclature of zein adopted at VIR after its separation by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in an acidic buffer was compared with the nomenclature of zein after polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) adopted among the foreign scientific community. The studies were performed on a large volume of accessions from the VIR collection as well as on breeding material provided by the country’s leading breeders.

Keywords: *Zea mays* L., maize storage proteins, protein markers, zein electrophoretic patterns, zein nomenclature, α -zein, β -zein, γ -zein, δ -zein

Acknowledgements: the research was performed within the framework of the state task according to the theme plan of VIR, Project No FGEM-2022-0009 “Structuring and disclosing the potential of hereditary variation in the global collection of cereal and groat crops at VIR for the development of an optimized genebank and its sustainable utilization in plant breeding and crop production”.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Sidorova V.V., Konarev A.V., Kerv Yu.A. Zein patterns as effective markers of valuable agronomic traits in maize. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(2):160-175. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-160-175

Введение

Большинство традиционных сортов кукурузы представляют собой сложные популяции, различающиеся по генотипическому составу. В последние десятилетия на смену таким генетически гетерогенным сортам пришли высокопродуктивные гибриды. Преимущества гибридов перед сортами-популяциями очевидны. Однако гибридная селекция требует более высокого уровня научного и агротехнического обеспечения и, что самое важное, нуждается в методах объективного контроля. Это обусловлено тем, что невозможно без ошибок и потерь разной природы, «на глаз», определить момент завершения создания генетически однородной линии, оценить уровень генетической чистоты и однородности полученных гибридов (как простых, так и разной степени сложности – многолинейных). Метод контроля должен не только быть воспроизводимым в разных лабораториях, но и базироваться на оцениваемых приборами дискретных характеристиках. Схема получения гибридных сортов обеспечивает большую управляемость селекционным процессом, а генетическая однородность повышает эффективность агротехнических приемов. Экономические показатели продукции, получаемой от гибридных сортов, во многом зависят от степени однородности и других свойств родительских линий. Главной задачей здесь является поиск такого сочетания линий, которое обеспечит в производстве высокий эффект гетерозиса. Основным источником получения инбредных линий кукурузы являются синтетические сорта и популяции, а также гибриды разной степени сложности. Инбридинг позволяет выявлять и устранять неблагоприятные аллели генов, которые сохраняются в гетерозиготном состоянии у сортовых популяций. Соответственно, переход на линейную (гибридную) селекцию у кукурузы сопровождается снижением генетического разнообразия, тем более что в большинстве стран для получения гибридов используется весьма ограниченное число инбредных линий.

Общеизвестно, что почти вся селекционная работа по кукурузе как в нашей стране, так и за рубежом базируется на использовании примерно двух десятков самоопыленных линий преимущественно зарубежной селекции (B73, B14, C103, Oh43, W64A и др.) или их производных, то есть большая часть мировой зародышевой плазмы была и остается в значительной мере не затронута селекционным процессом (Shmarayev, 1983; Mikov, 2002; Troyer, 2009). По официальным данным, вклад сорта 'Reid's Yellow Dent' в зародышевую плазму современных гибридов США составляет 56%. Другие популярны сорта, такие как 'Lancaster Sure Crop' и 'Minnesota', вносят оставшиеся 44%. Эти лучшие сорта стали основой для высоко адаптированных коммерческих гибридов (Тройер, 2009). Но селекционная практика, ориентированная на ограниченный пул исходного (пусть даже элитного) материала, приводит к снижению адаптивных свойств и может стать причиной всплеск болезней на посевах кукурузы. Для предотвращения дальнейшего обеднения генетического разнообразия исходного и селекционного материала кукурузы, губительного для селекции и производства, учеными Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) в настоящее время принимаются активные меры по его сохранению и обогащению.

Богатейшими «генетическими» источниками улучшения биохимических характеристик зерна кукурузы являются образцы из Латинской Америки. Селекционеры

США для улучшения питательной ценности белка кукурузы используют зародышевую плазму южноамериканской расы крахмалистой кукурузы Sogoico, которая отличается повышенным содержанием белка с высоким уровнем лизина. При изучении местных рас кукурузы Венесуэлы, Боливии и Колумбии были обнаружены новые источники гена *opaque-2* и его модификации (Tarakanov, Chmeleva, 1986). Ценным источником нового генетического материала для селекции также является кукуруза Мексики. Изучение происхождения (родословных) мексиканских форм показало, что многие из них в результате неоднократной интрогрессии теосинте являются ценным исходным материалом, содержащим зародышевую плазму дикого родича (Shmarayev, 1986; Hake, Ross-Ibarra, 2015).

В коллекции кукурузы ВИР особую ценность для селекции и селекционерского производства имеет гибридный материал, особенно синтетические сорта, главные достоинства которых состоят в том, что они имеют высокий уровень генетического полиморфизма и хорошо проработаны в селекционном плане.

Благодаря внедрению в селекцию методов ДНК- и белковых маркеров в раскрытии уровней и свойств генетической гетерогенности морфологически однородных популяций произошел решительный сдвиг. Термин «белковые маркеры» был впервые введен В. Г. Конаревым в серии статей под общим названием «Белковые маркеры геномов пшеницы и ее диких сородичей» (Konarev et al., 1970a, b). Белковые маркеры, основанные на электрофоретических спектрах запасных белков семян, с самого начала их становления и использования показали свою пригодность на всех этапах сопровождения гибридной селекции. Относительная простота методик получения спектров белков и их интерпретации обеспечивает достоверность и хорошую воспроизводимость в ходе анализа исходного и селекционного материала. Одно из базовых свойств маркера – независимость состава спектра от условий выращивания (Konarev, 2002). Под такими условиями подразумеваются соответствующие культуре почвенно-климатические, погодные и прочие внешние обстоятельства.

Запасной белок кукурузы (зеин) вызывает научный интерес у селекционеров всех стран именно как маркер в селекции на качество. Ценным для практики разработкам всегда предшествуют фундаментальные исследования, что в полной мере относится к зеину. Биохимической и генетической характеристике этого белка посвящены многочисленные исследования, выполненные преимущественно в последней четверти двадцатого столетия. Зеин составляет около 70% от общего количества белка зерновки и относится к спирторастворимым запасным белкам эндосперма; он накапливается в так называемых белковых телах (Wu, Messing, 2014). Гены зеина образуют мультигенные семейства, при этом гаплоидный геном содержит до 100 генов, относящихся к 15 семействам, а триплоидный эндосперм – около 300 генов (Wilson, 1986; Lending, Larkins, 1989; Woo et al., 2001). Для распознавания различных типов зеина были разработаны несколько систем классификации. Однако классификация типов зеина усложняется их различной растворимостью в водно-спиртовых растворителях и способностью некоторых белков образовывать дисульфидные связи (Esen, 1987; Holding, 2014). Изоэлектрофокусированием (IEF) зеин разделили на 41 компонент, в то время как спектры, полученные после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-

PAGE), включали около 15 компонентов. Каждый метод давал характерные типы спектров зеина для различных образцов кукурузы (Wilson, 1986; Sidorova et al., 1987). Однако ни IEF, ни SDS-PAGE, используемые отдельно, не могли адекватно фракционировать зеин на компоненты. Поэтому два метода были объединены. При анализе методом двумерного электрофореза отдельные компоненты зеина, разделенные с помощью IEF, были фракционированы с помощью SDS-PAGE (Wilson, 1985).

В 1989 г. была предложена система классификации зеина, основанная на структуре белка (Lending, Larkins, 1989), а не только на различиях в подвижности в SDS-PAGE или растворимости. С использованием иммунной и электронной микроскопии была создана модель белкового тела и разработаны ген-специфичные и антитело-специфичные зонды, которые позволили изучить картину экспрессии генов запасного белка в развивающемся эндосперме.

Современные методы, применяемые в исследованиях зеина, включают сверхэкспрессию трансгенов, нокдаун генов с помощью РНК-интерференции, делеционный мутагенез и инструменты редактирования генома. Большинство исследований сосредоточено на использовании этих инструментов для выяснения роли генов зеина в развитии эндосперма кукурузы (Khan et al., 2019).

Из литературных источников известно, что SDS-PAGE, безусловно, является наиболее частым методом исследования зеина. Разделение зеина с помощью SDS-PAGE воспроизводимо в разных лабораториях, однако число компонентов и их распределение в спектрах не является таковым. Это в значительной степени обусловлено необычной структурой белков, в результате чего скорость их миграции в геле отличается от предсказанной на основании молекулярной массы. Отдельные компоненты зеина имеют разный аминокислотный состав. Поскольку эти белки являются самыми количественно преобладающими в эндосперме кукурузы, то они вносят значительный вклад в аминокислотный состав всего эндосперма и напрямую влияют на его питательную ценность.

Зарубежными учеными была разработана повсеместно принятая номенклатура, которая классифицировала запасные белки кукурузы на основе их растворимости и структурных отношений на несколько групп: α -, β -, γ - и δ -зеины (Esen, 1987; Coleman, Larkins, 1999; Holding, Larkins, 2009).

В это же время в лаборатории биохимии и молекулярной биологии ВИР разработана номенклатура для классификации компонентов суммарного зеина после электрофореза в полиакриламидном геле в кислом буфере (PAGE). В ее основе, кроме размера полипептидов, лежит их электрофоретическая подвижность. Электрофоретический спектр зеина содержит от 12 до 22 основных компонентов. При регистрации их записывают в величинах электрофоретической подвижности (rf). Позиции основных компонентов зеина изученных нами инбредных линий находятся в пределах rf 32–92.

Анализ полиморфизма зеиновых спектров, полученных путем электрофореза в кислом буфере, положен в основу международных и отечественных стандартных методов идентификации линий и сортов, а также оценки степени гибридности кукурузы (International Rules..., 1996; Konarev, 2000; Pomortsev et al., 2004). По спектрам компонентов зеина возможна не только идентификация инбредных линий, но и выявление полиморфизма популяций, идентификация и регистрация генотипов, определение их соотношения в популяциях и т. д. Все это

необходимо для оценки генетической структуры сортов и гибридов, а также для сохранения и эффективного использования существующего генофонда кукурузы в селекции. Маркерная технология уже несколько десятилетий успешно используется в ВИР для изучения пшеницы, ржи, тритикале, ячменя, кукурузы, подсолнечника, некоторых овощных культур и др. В 2012–2018 гг. электрофорез белков был внедрен в систему Россельхознадзора (утвержден Министерством сельского хозяйства Российской Федерации в 2002 г.) в качестве стандартного лабораторного метода семенного контроля. В Беларуси метод имеет статус государственного стандартного и включен в ГОСТ этой страны. Его надежность неоднократно подтверждена на большом коллекционном и селекционном материале и даже примерами из арбитражной практики (Konarev et al., 1990; Kerv, Sidorova, 2018).

Маркерная технология включает следующие этапы:

1. Электрофоретический анализ запасных белков позволяет контролировать процесс создания генетически однородных инбредных линий, что является одним из условий получения высокопродуктивных гибридов. У генетически чистой линии все зерна выборки (50–100 семян) дают одинаковый спектр. Анализ спектров зеина позволяет полностью контролировать процесс перехода большинства генов в гомозиготное состояние, наглядно показывая селекционеру момент, на котором создание той или иной линии завершается. Разным линиям для достижения полной гомозиготности требуется различное число поколений самоопыления. Благодаря использованию электрофореза зеинов ускоряется процесс создания генотипов и улучшается «качество» инбредных линий. Для большинства инбредных линий характерны специфические спектры зеина, что делает возможным их маркирование с последующей паспортизацией, регистрацией и созданием баз данных спектров не только линий, но и созданных на их основе межлинейных гибридов разной степени сложности.

2. Спектры зеина позволяют с большой надежностью идентифицировать и регистрировать генотипы – выявлять генотипический состав популяций, определяя соотношение генотипов в популяциях, оценивать степень их генетического родства и т. п. По составу спектров зеина можно судить о родстве линий и сортов (предполагать генетическую близость и общность происхождения).

3. В ходе дальнейшего развития методологии было установлено, что в спектрах зеина, помимо компонентов, маркирующих генотипы, обнаруживаются такие, наличие которых с различным уровнем достоверности коррелирует с проявлением селекционно ценных и экономически важных признаков и, следовательно, они могут служить маркерами этих признаков.

Предлагаемая вниманию читателей статья обобщает результаты многолетнего изучения генофонда кукурузы в ВИР. На конкретных примерах показана эффективность использования белковых маркеров в селекции. Кроме того, проведено сравнение номенклатуры зеина после разделения его электрофорезом в полиакриламидном геле (PAG) в кислом буфере, принятой в ВИР, с номенклатурой зеина после SDS-PAGE, повсеместно используемой в зарубежном научном сообществе.

Материалы и методы

Исследования проводили в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР в период с 1987 по 2022 г. Объект исследования – линии, популяции, сорта и гибриды куку-

рузы (*Zea mays* L.) из коллекции ВИР и предоставленные ведущими селекционерами страны, а также образцы диких родичей кукурузы – теосинте (*Euchlaena* Schrad.) из коллекции ВИР, всего около полутора тысяч образцов.

Электрофорез зеина в кислом буфере проводили в вертикальных пластинах полиакриламидного геля. Пластина содержит 10% акриламида и 8 М мочевины. В раствор для экстракции зеина входит 6 М мочевины и 0,01 М дитиотрейтол. Электрофорез идет без охлаждения в течение 4 ч 30 минут при напряжении 500–580 В по стандартной методике ISTA (International Seed Testing Association), разработанной с участием отдела биохимии и молекулярной биологии ВИР (International rules..., 1996). Окрашивание гелевых пластин длится 16 часов, затем пластины отмываются, высушиваются и сканируются. Регистрация электрофоретических спектров зеина проводилась путем сравнения со стандартом – французской самоопыленной линией кремнистой кукурузы «F2»,

комбинации были обозначены нами следующим образом – «36–39–40», «38–57», «52–67», «64–69». Отдельные компоненты из комбинаций также могут встречаться самостоятельно.

Иллюстрации (рис. 1–4) демонстрируют различия в уровне генетического полиморфизма сортов – от высокого у 'Reid's Yellow Dent' и 'Schindelmeiser', до низкого у 'Lancaster Sure Crop' и 'Funk's Crug Corn'. Сорт зубовидной кукурузы 'Reid's Yellow Dent' отличается высоким полиморфизмом. Тем не менее и для него были выявлены маркерные компоненты, встречающиеся у большинства генотипов. Компоненты же в позициях 40 и 63 имеют 100-процентную встречаемость. Высокий полиморфизм по спектрам зеина сорту обеспечивают разные сочетания компонентов в позициях 64, 65 и 66. В нашей базе электрофоретических спектров оказалось много линий, которые имели близкое сходство по указанным маркерам с биотипами (генотипами) этого сорта (рис. 1).

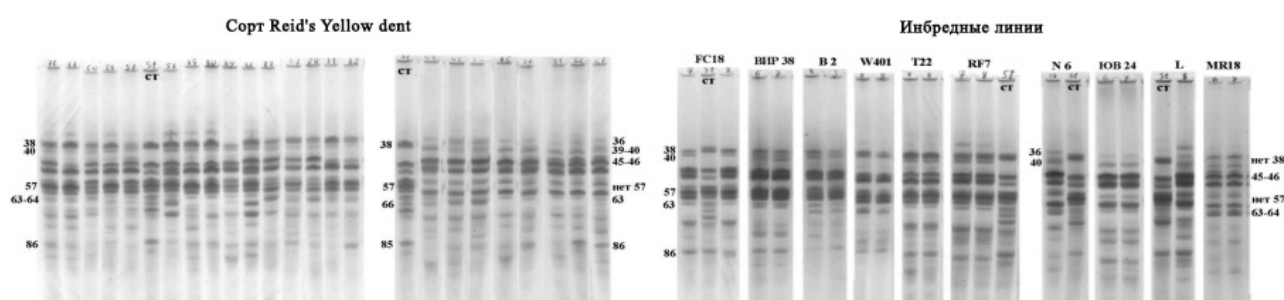


Рис. 1. Маркерные компоненты, идентичные для спектров зеина сорта 'Reid's Yellow Dent' и ряда инбредных линий (цифрами показаны позиции маркерных компонентов («39–40», 63, 64 и 65); стандарт (СТ) – инбредная линия «F2»)

Fig. 1. Marker components identical for the zein patterns of cv. 'Reid's Yellow Dent' and a number of inbred lines (the numbers show the positions of the marker components ("39–40", 63, 64 and 65); standard reference (CT): inbred line "F2")

экстракт зеина которой наносился на каждую пластину. Номера белковых компонентов соответствуют величинам их электрофоретической подвижности (Kerv, Sidorova, 2018).

Результаты и обсуждение

Благодаря исследованиям, проводимым в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР, база данных маркерных компонентов зеина постоянно пополняется. Информация, заключенная в этой базе, в дальнейшем используется для проведения сравнительного анализа линий, сортов и гибридов кукурузы, при подборе исходных родительских форм (сортов, линий, простых гибридов и т. д.) для достижения высокого эффекта гетерозиса, и для других селекционных целей. По маркерным компонентам можно судить о родословных используемых инбредных линий, что необходимо учитывать при подборе генетически отдаленных пар для скрещивания. Такой подход позволяет избежать скрещивания близкородственных или даже сестринских линий, при котором фактически нет гетерозисного эффекта, и дает возможность получить гибриды, в которых гетерозис хорошо проявляется.

В процессе работы было выяснено, что некоторые компоненты в белковых спектрах могут быть «сцеплены», то есть образуют комбинации полипептидов. Такие

Для сортов кремнистой кукурузы характерна наибольшая встречаемость типов спектров с комбинацией маркерных компонентов «38–57». Так, у сорта кремнистой кукурузы 'Schindelmeiser' комбинация маркерных компонентов «38–57» встречается в спектрах с частотой 98%. Также в большинстве спектров этого сорта присутствуют компоненты в позициях 63 и 65. Из нашей базы данных были подобраны инбредные линии, электрофоретические спектры которых имели сходство с этим сортом по указанным выше маркерам (рис. 2). Другой сорт кремнистой кукурузы 'Gloria Janetzis' имеет 100% спектров с комбинацией «38–57» (Sidorova et al., 2012).

Установлено, что маркерами сорта зубовидной кукурузы 'Lancaster Sure Crop' могут служить комбинация компонентов «52–67» (встречаемость 100%) и отдельные компоненты (позиции 63 и 64), присутствующие в большинстве спектров сорта. Из нашей базы данных были подобраны линии, электрофоретические спектры которых имеют упомянутые выше маркеры (рис. 3). В спектрах линий кремнистой кукурузы комбинация компонентов «52–67» встречается очень редко. Эта комбинация маркерных компонентов отсутствует и в спектрах сортов кремнистой кукурузы 'Schindelmeiser' (см. рис. 2) и 'Gloria Janetzis'.

У позднеспелого сорта зубовидной кукурузы 'Funk's Crug Corn' спектры с комбинацией маркерных компонентов «38–57» не встречаются. Для этого сорта в качестве

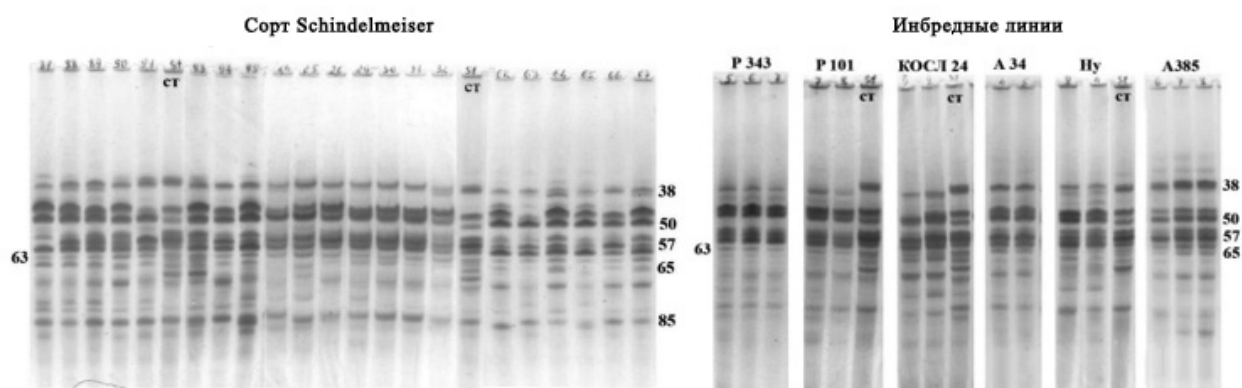


Рис. 2. Маркерные компоненты, идентичные для спектров зеина сорта 'Schindelmeiser' и ряда инбредных линий (цифрами показаны позиции маркерных компонентов («38–57», 63 и 65); стандарт (ст) – инбредная линия «F2»)

Fig. 2. Marker components identical for the zein patterns of cv. 'Schindelmeiser' and a number of inbred lines (the numbers show the positions of the marker components ("38–57", 63 and 65); standard reference(ст): inbred line "F2")

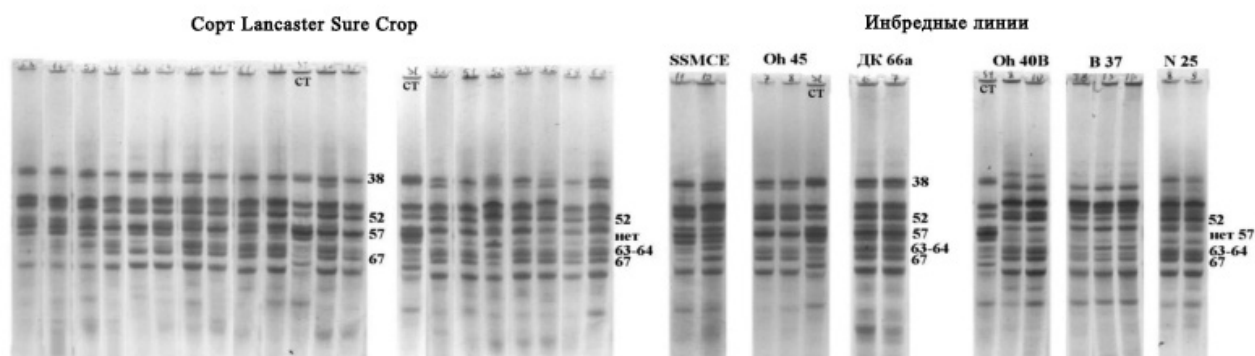


Рис. 3. Маркерные компоненты, идентичные для спектров сорта 'Lancaster Sure Crop' и ряда инбредных линий (цифрами показаны позиции маркерных компонентов («52–67», 63 и 64); стандарт (ст) – инбредная линия «F2»)

Fig. 3. Marker components identical for the zein patterns of cv. 'Lancaster Sure Crop' and a number of inbred lines (the numbers show the positions of the marker components ("52–67", 63 and 64); standard reference (ст): inbred line "F2")

маркеров установлены компоненты в позициях 40, 45 и 46, присутствующие в большинстве спектров, а также маркерная комбинация компонентов «64–69» (встречаемость 96%). Линий с такими маркерами в нашей базе данных оказалось немного (рис. 4).

Поскольку сорта и линии кремнистой и зубовидной кукурузы имеют различную генетическую основу, их можно использовать при создании высокоурожайных гетерозисных гибридов. Лучшие двойные гибриды были получены скрещиванием инбредных линий, созданных на основе либо выделенных из разных сортов. Родительские линии, созданные на основе разных сортов кукурузы, как правило, существенно отличаются друг от друга по наличию маркерных компонентов в спектрах. При скрещивании они дают гибриды с высоким гетерозисным эффектом (Sidorova et al., 2012).

В результате многократных самоопылений у инбредных линий могут снизиться устойчивость к болезням, урожайность и другие экономически важные биологические показатели. Такие линии требуют своевременного улучшения. Для этого селекционеры скрещивают их со свободноопыляющимися сортами. Успех достигается при использовании генетически разнородного материала. В выборе сорта для скрещивания существенную помощь также могут оказать белковые (зеиновые) маркеры. В ка-

честве подтверждения этого приведем пример из практики. Селекционер В. Г. Гаркушка на Кубанской опытной станции ВИР создал линию 205МВ. Для скрещивания были подобраны формы, отличающиеся по спектрам зеина. Материнской формой служил сорт кремнистой кукурузы MA21. Спектр линии MA21 отличался комбинацией маркерных компонентов «64–69». В сорте 'Schindelmeiser' спектров с комбинацией компонентов «64–69» оказалось всего 4%. Скрещиваемые формы были очень разными не только фенотипически, но и по спектрам зеина (рис. 5). Созданная в результате этой работы линия 205МВ обладает высокой комбинационной способностью и в настоящее время с успехом используется в селекции.

Известно много районированных гибридов селекции Краснодарского научно-исследовательского института сельского хозяйства (КНИИСХ) им. П.П. Лукьяненко, в которые вошла линия зубовидной кукурузы W64 с высокой комбинационной способностью. Она использовалась в качестве родительской формы в простом межлинейном гибриде (W64 × Сг25) и во многих других гибридах. Линии различаются по маркерным компонентам зеина. Так, в спектре материнской линии W64 нет комбинации маркерных компонентов «38–57», но имеется интенсив-

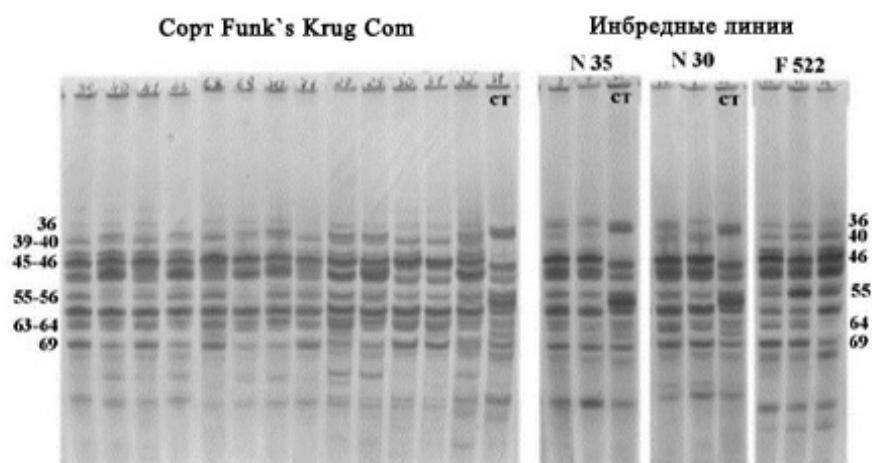


Рис. 4. Маркерные компоненты, идентичные для спектров зеина сорта 'Funk's Krug Corn' и ряда инбредных линий (цифрами показаны позиции маркерных компонентов (40, «45–46», 63 и «64–69»); стандарт (ст) – инбредная линия «F2»)

Fig. 4. Marker components identical for the zein patterns of cv. 'Funk's Krug Corn' and a number of inbred lines (the numbers show the positions of the marker components (40, "45–46", 63 and "64–69"); standard reference (ст): inbred line "F2")

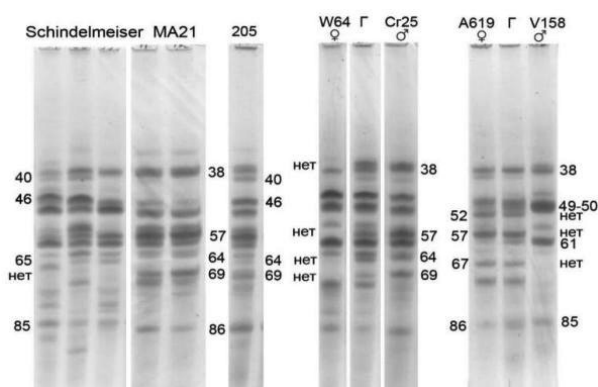


Рис. 5. Контроль наследования маркерных компонентов родительских форм в ходе создания инбредной линии 205MB и простых позднеспелых высокогетерозисных гибридов (Г) W64 × Cr25 и A619 × V158

Fig. 5. Control over the inheritance of marker components in parental forms during the development of the 205MB inbred line and simple late-maturing highly heterotic hybrids (G) W64 × Cr25 and A619 × V158

ный компонент в позиции 46, которого нет в отцовской линии. В то же время в спектрах отцовской линии присутствуют сразу две комбинации маркерных компонентов «38–57» и «64–69», которые являются и маркерами гибридности.

На рисунке 6 представлены спектры инбредных линий (N6, Mc401 и др.) и их гибридов (Г), отличающихся высокой степенью гетерозиса. Цифрами (32, 37, 38, 40, 69 и т. д.) обозначены основные маркерные компоненты гибридности (происходящие от отцовской линии, присутствующие у гибрида и отсутствующие у материнской линии). Из представленных спектров видно, что родительские линии высокогетерозисных гибридов достаточно сильно отличаются друг от друга по компонентному составу (по трем-четырем компонентам).

Для увеличения генетического разнообразия генофонда культурных форм целесообразны отдаленные скрещивания с дикорастущими родичами. Успех селекции кукурузы с привлечением генетического материала дикорастущих родичей во многом зависит от знания характера и степени их генетического разнообразия, а также родства с культурными формами. Гибридизация

культурных растений с дикими родичами позволяет обогатить их генофонд, который сужается (обедняется) в ходе длительного искусственного отбора перспективных форм в процессе селекции. Для кукурузы таковым является теосинте (*Euchlaena*). Нами изучены белковые спектры зеина дикорастущего теосинте и его естественного гибрида с кукурузой. Целью было определить степень участия дикорастущего родича в формировании гибрида. Установлено, что изученный образец теосинте состоит из двух генетически различных форм. Они отличаются по наличию и отсутствию в спектрах зеина маркерного компонента в позиции 57. Компонентный состав электрофоретических спектров зеина естественного гибрида кукурузы и теосинте позволяет высказать предположение о различной избирательности скрещивания этих форм теосинте с кукурузой. Преимущественно скрещиваются с кукурузой растения теосинте, у которых в спектрах зеина отсутствует маркерный компонент в позиции 57 (рис. 7).

Информация о возможном участии теосинте в формировании различных сортов кукурузы подробно освещалась нами ранее (Sidorova et al., 2010a; 2015).

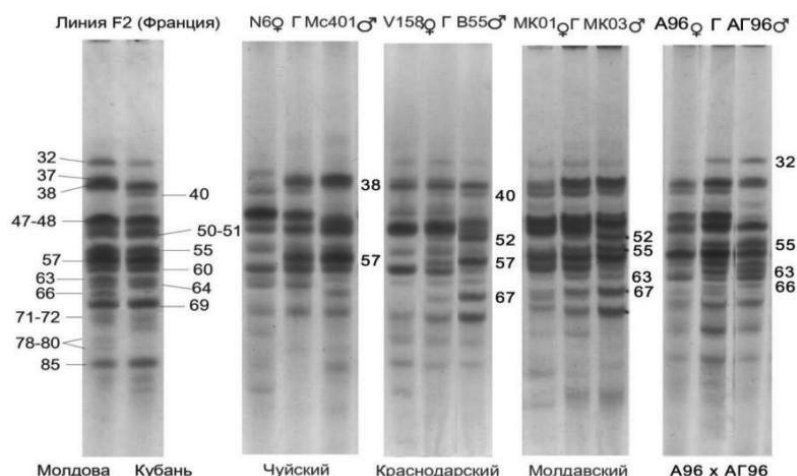


Рис. 6. Наследование компонентов зеина исходных родительских линий в простых гибридах (Г) первого поколения: Чуйский, Краснодарский, Молдавский и A96 × AГ96

(цифрами обозначены маркерные компоненты гибридности; стандарт – инбредная линия «F2»)

Fig. 6. Inheritance of zein components in the original parental lines by simple hybrids (G) of the first generation: Chuisky, Krasnodarsky, Moldavsky, and A96 × AГ96

(the numbers indicate the marker components of hybridity; standard reference: inbred line “F2”)

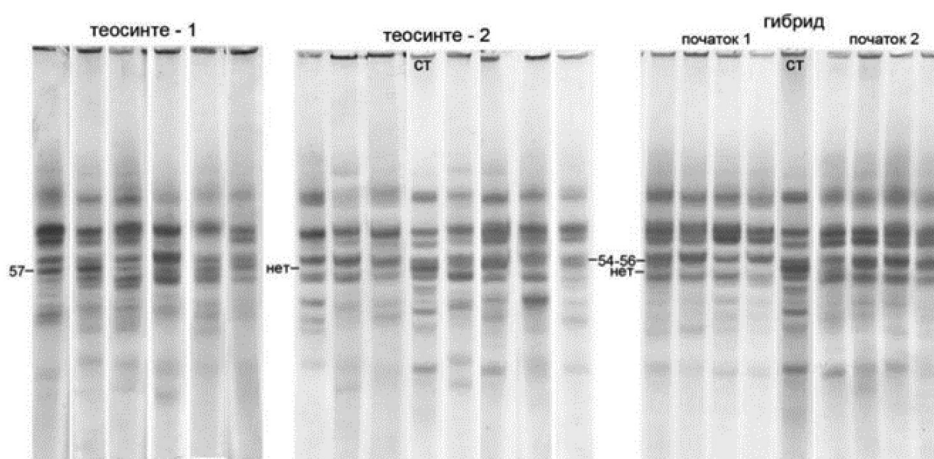


Рис. 7. Электрофоретические спектры зеина теосинте и его естественного гибрида с кукурузой: Теосинте-1 и Теосинте-2 – две генетические формы теосинте; стандарт (СТ) – инбредная линия «F2»

Fig. 7. Zein electrophoretic patterns of teosinte and its natural hybrid with maize: Teosinte-1 and Teosinte-2, two genetic forms of teosinte; standard reference (СТ): inbred line “F2”

В настоящее время назрела необходимость провести сравнение номенклатуры зеина после разделения его электрофорезом в полиакриламидном геле (ПАГ) в кислом буфере, принятой в ВИР, с номенклатурой зеина после SDS-PAGE, используемой зарубежными учеными. Изначально для этого нами был изучен ряд образцов кукурузы, ранее проанализированных учеными Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси с помощью SDS-PAGE (Orlovskaya et al., 2015). Мы проанализировали эти же образцы в ПАГ в кислом буфере и сопоставили компоненты спектров, полученных с помощью двух методик. В дальнейшем мы планируем отдельную публикацию по этой работе. Полученные теоретические данные по компонентному составу спектров были использованы при написании этой статьи.

Самым распространенным классом запасного белка кукурузы является α-зеин, полипептиды которого имеют молекулярную массу (Mr) ~ 19 кДа и 22 кДа. Оценки

размера и сложности этого класса зеина у разных исследователей значительно различаются. Полипептиды α-зеина содержат от 210 до 245 аминокислотных остатков. Все они отличаются высоким содержанием глутамина (25%), лейцина (20%), аланина (15%) и пролина (11%); полипептиды, содержащие лизин, не обнаружены (Thompson, Larkins, 1994). Для α-зеина была разработана система классификации. Хотя принято делить его на две группы на основе миграции в SDS-PAGE (Coleman, Larkins, 1999), сравнение последовательностей четко показывает разделение на три подгруппы: α-зеин с Mr ~ 22 кДа и подгруппы α-зеина, обозначенные В и D, с Mr ~ 19 кДа. Белки внутри каждой подгруппы имеют 75–95% идентичных аминокислотных остатков, тогда как сходство между подгруппами сохраняется только на уровне 40–55%. Гены, кодирующие белки α-зеина кукурузы, составляют большое мультигенное семейство примерно из 75 членов. Это семейство можно разделить на четыре

подсемейства на основе нуклеотидных последовательностей образующих его генов и предполагаемых аминокислотных последовательностей кодируемых белков (Liu, Rubenstein, 1992; Feng et al., 2009). Методом иммулокализации было показано, что большая часть генов α -зеина либо не активны, либо их экспрессия в развивающемся эндосперме находится на очень низком уровне (Woo et al., 2001). Кроме разницы в размерах существует значительная гетерогенность полипептидов α -зеина по заряду при IEF и двумерном электрофорезе. Весьма эффективно выявляется гетерогенность α -зеина методом электрофореза в PAG в кислом буфере. Компонентам α -зеина с $M_r \sim 19$ кДа и 22 кДа (по результатам SDS-PAGE) при электрофорезе в PAG в кислом буфере в спектрах соответствуют две интенсивно проявляющиеся зоны.

Мы успешно использовали гетерогенность α -зеина для идентификации инбредных линий и гибридов. Ниже представлены данные электрофореза в PAG в кислом буфере белков разных инбредных линий, которые отличались по фенотипу (кремнистые, зубовидные, восковидные и др.), периоду созревания (раннеспелые и позднеспелые) и биохимическим характеристикам зерна (рис. 8).

Все образцы проверяли на генетическую однородность, то есть все зерна выборки имели один, свойственный данной линии тип спектра зеина (Kerv, Sidорова, 2018). Наибольшее количество компонентов спектров, полученных при электрофорезе зеина в PAG в кислом буфере (позиции от 45 до 52), соответствует α -зеину с $M_r \sim 22$ кДа в спектрах, полученных по методике SDS-PAGE. У одних линий α -зеину с $M_r \sim 22$ кДа соответствует четыре компонента, записанных в величинах r_f , у других – только один или два (см. рис. 8). α -зеину с 19 кДа соответствуют компоненты, которые могут проявляться в позициях от 53 до 61. У разных линий эта зона может иметь от одного до трех компонентов. Это показывает, что экспрессия α -зеинов может находиться на низком уровне. Среди компонентов α -зеина с $M_r \sim 22$ кДа нами был выявлен маркер восковидной кукурузы, соответствующий позиции 47 по номенклатуре, принятой в ВИР (рис. 8, 9).

В селекции при создании новых линий восковидной кукурузы в качестве исходной формы часто используют лучшие линии зубовидной кукурузы. На рисунке 9 мы привели несколько примеров этого процесса. Сравнительный анализ спектров зеина линии зубовидной кукурузы

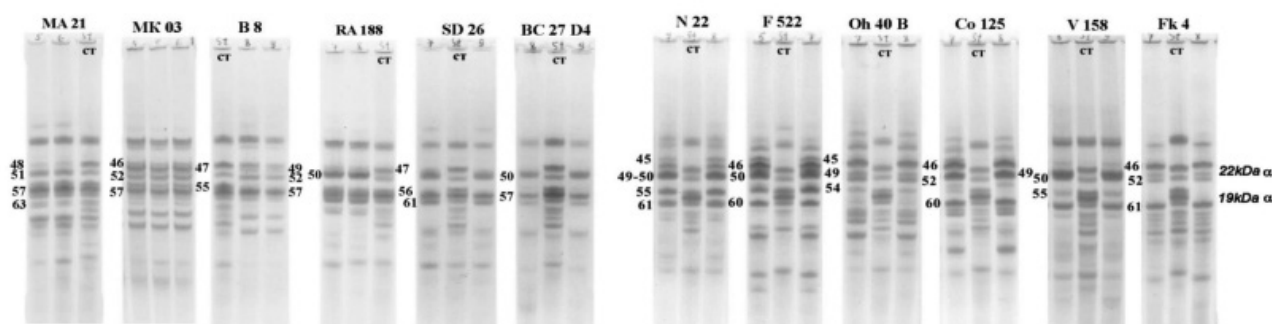


Рис. 8. Электрофоретические спектры зеина инбредных линий кукурузы (цифрами обозначены позиции компонентов, по которым выявлены различия; стандарт (ст) – инбредная линия «F2»)

Fig. 8. Zein electrophoretic patterns of inbred maize lines (the numbers indicate the positions of components for which differences were found; standard reference (ct): inbred line “F2”)

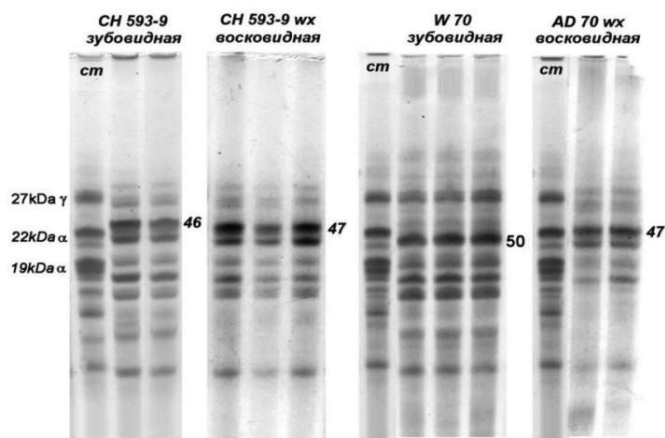


Рис. 9. Электрофоретические спектры зеина исходных линий зубовидной кукурузы и новых селекционных линий восковидной кукурузы (компонент в позиции 47 – маркер восковидности; стандарт (ст) – инбредная линия «F2»)

Fig. 9. Zein electrophoretic patterns of the original lines of dent maize and new breeding lines of waxy maize (the component in position 47 is a waxiness marker; standard reference (ct): inbred line “F2”)

рузы СН593-9 и ее аналога после насыщающих скрещиваний с носителем гена *wx* (СН593-9 *wx*) показал снижение интенсивности проявления (окрашивания) большинства компонентов в спектре зеина новой линии восковидной кукурузы. Однако наиболее интересен факт появления в спектре новой линии восковидной кукурузы интенсивного компонента в позиции 47, которого нет в спектрах исходной линии. Другая линия восковидной кукурузы АД70 *wx* создана на основе линии зубовидной кукурузы W70. Спектр новой линии отличается от исходной линии низкой интенсивностью большинства компонентов и даже потерей некоторых из них. Новая линия АД70 *wx* отличается присутствием в спектре интенсивного компонента в позиции 47, отсутствующего в спектре исходной линии зубовидной кукурузы. Таким образом, компонент в позиции 47 может служить белковым маркером для линий восковидной кукурузы. Примеры проявления маркера восковидности в спектрах новых восковидных линий представлены нами в отдельных публикациях (Matveeva et al., 2015; Sidorova et al., 2018).

Вторым по величине классом зеина является γ -зеин. Уровень экспрессии генов γ -зеина гораздо выше, чем генов α -зеина, несмотря на то что последние кодируются большим числом генов (Kodrzycki et al., 1989). Это компоненты γ -зеина с Мг ~ 16 и 27 кДа, которые при фракционировании методом SDS-PAGE соответствуют одной или двум зонам в спектрах, полученных при электрофорезе зеина в кислом буфере. Они богаты цистеином и растворяются только в присутствии редуцирующего агента, поэтому при изучении вторичной структуры их молекул существуют определенные сложности. Размер белка γ -зеина с Мг ~ 27 кДа составляет примерно 180 аминокислотных остатков. Он характеризуется высоким содержанием цистеина (7%) и исключительно высоким – пролина (25%). В отличие от α -зеина, в γ -зеине присутствуют лизин и триптофан (Wang, Esen, 1986). При электрофорезе в кислом буфере γ -зеину соответствуют компоненты с самой низкой подвижностью, за исключением компонента с Мг ~ 16 кДа.

Полипептиды зеина с Мг ~ 16 кДа (γ -зеин) и 15 кДа, относящиеся к классу β -зеина, по распространенности являются следующими после α -зеина белками. β -зеин с Мг ~ 15 кДа состоит из 160 аминокислотных остатков,

содержит меньше глутамина (16%), лейцина (10%) и пролина (9%), чем α -зеин, но в нем значительно больше серосодержащих аминокислот метионина (7%) и цистеина (4%).

Полипептиды с Мг ~ 15 кДа (β -зеин) и 16 кДа (γ -зеин) имеют относительно низкую молекулярную массу. По всей вероятности, γ -зеины с Мг ~ 27 кДа и 50 кДа возникли независимо из дублированных копий предкового гена в результате вставки участков tandemных пептидных повторов. Пространственная экспрессия β -зеина с Мг ~ 15 кДа была очень похожа на экспрессию γ -зеина с Мг ~ 27 кДа во время развития эндосперма (Lending, Larkins, 1989; Coleman, Larkins, 1999; Woo et al., 2001).

Следует отметить, что среди полипептидов γ -зеина нами были выявлены маркеры раннеспелости – γ -зеины с Мг ~ 27 кДа и 16 кДа, которые соответствуют комбинации компонентов «38–57». Известно, что признак раннеспелости наиболее часто встречается среди образцов кремнистой кукурузы и реже – среди образцов зубовидной кукурузы. Перед нами стояла задача выявить в электрофоретических спектрах зеина маркерные компоненты признака раннеспелости, то есть компоненты, характерные для ультрараннеспелых и раннеспелых образцов кукурузы и отсутствующие в спектрах зеина позднеспелых линий и сортов кукурузы. Для проведения данной работы мы выбрали контрастные по периоду вегетации самоопыленные линии и сорта – раннеспелые образцы групп спелости ФАО 100-299 и 42–55 дней до цветения початка и позднеспелые группы спелости ФАО 700-800 и 70–80 и более дней до цветения початка. В качестве стандарта взяли раннеспелую самоопыленную линию «F2» кремнистой кукурузы. Установлено, что в спектрах зеина большинства изученных ультрараннеспелых и раннеспелых линий и сортов кукурузы присутствует маркерная комбинация компонентов «38–57». На рисунке 10 представлены лишь некоторые из них. Для сравнения изучили позднеспелые линии зубовидной кукурузы. Маркерная комбинация компонентов «38–57», характерная для спектров раннеспелых линий кремнистой, полузубовидной и зубовидной кукурузы, в спектрах позднеспелых образцов не выявлена (см. рис. 10). Нет ее и в спектрах позднеспелого сорта 'Funk's Crug Corn' (см. рис. 4). Эффективность и надежность выявлен-

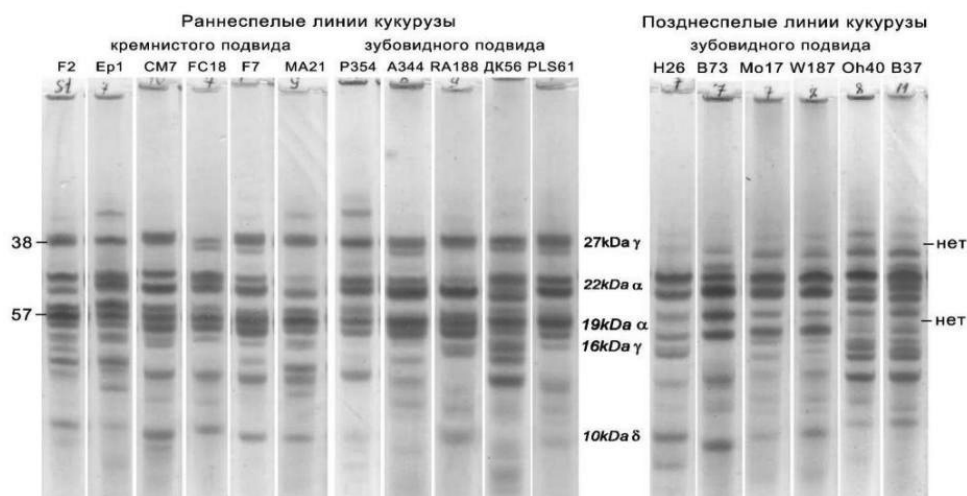


Рис. 10. Электрофоретические спектры зеина раннеспелых и позднеспелых линий кукурузы (комбинация компонентов «38–57» – маркер раннеспелости; стандарт (st) – инбредная линия «F2»)

Fig. 10. Zein electrophoretic patterns of early- and late-maturing maize lines (the combination of components «38–57» is a marker of earliness; standard reference (st): inbred line «F2»)

ных маркеров признака раннеспелости продемонстрирована на раннеспелых и позднеспелых образцах кукурузы (линиях, гибридах, сортах) из коллекции ВИР, а также на линиях и гибридах, предоставленных ведущими селекционерами нашей страны. Информация об этих маркерах более подробно отражена в наших отдельных публикациях (Sidorova et al., 2004, 2012).

Наименее распространенным, но четко различимым является γ -зеин с $M_r \sim 50$ кДа. Относительная подвижность этого белка заметно отличается от его расчетной $M_r \sim 33$ кДа (Woo et al. 2001). Полипептид с $M_r \sim 50$ кДа (γ -зеин) выявлен нами в линиях и сортах лопающейся кукурузы, зерновки которой характеризуются большим удельным весом стекловидного эндосперма. По номенклатуре зеина после электрофореза в ПАГ в кислом буфере, принятой в ВИР, γ -зеину с $M_r \sim 50$ кДа соответствует компонент в позиции 32, имеющий самую низкую подвижность. В результате анализа спектров зеина большого числа линий и местных сортов лопающейся кукурузы из коллекции ВИР было выяснено, что отличительным маркером для изученных образцов служит присутствие в их электрофоретических спектрах компонента в позиции 32. Этот компонент одновременно является одним из маркеров гибридности при скрещивании линий зубовидной кукурузы и новых линий лопающейся (если они используются в качестве отцовской формы), дающих гетерозисный эффект (рис. 11). Из новых линий лопающейся кукурузы выделена линия АГ69, которая имела высокую комбинационную способность и высокие технологические и вкусовые качества зерна. Так как эта линия является хорошим опылителем, она участвовала в получении многих гибридов в качестве отцовской формы. Чем интенсивнее в спектрах гибридов проявлялся компонент в позиции 32, тем более высокие технологические свойства (взрываемость) имели эти образцы. Так, гибриды, в спектрах зеина которых отсутствовал компонент в позиции 32, теряли свои технологические качества (зерно не взрывалось). Новая линия лопающейся кукурузы АГ96 создана на основе зубовидной линии А96. Для электрофоретического спектра этой линии характерно наличие интенсивных компонентов в позициях 32 и 37 и комбинации компонентов «38–57». Компоненты в позициях 32 и 66 вошли в генотип новой линии от лопающейся кукурузы, участвовавшей в создании линии

АГ96. Основные компоненты, характерные для новой линии АГ96, обнаружены также в белозерных местных сортах лопающейся кукурузы к-683 (см. рис. 11) и к-241. Высокогетерозисный гибрид, полученный скрещиванием линии зубовидной кукурузы А96 с линией лопающейся кукурузы АГ96, был изучен методом электрофореза. Линии А96 и АГ96 различаются по семи компонентам. Маркерами гибридности в данной комбинации являются только два компонента в позициях 32 и 66, присутствующие в спектрах отцовской линии (АГ96) и отсутствующие в материнской линии (А96). Однако у материнской линии есть несколько компонентов, отсутствующих у отцовской линии. Это увеличивает разницу родительских линий. Как правило, чем сильнее отличие между материнскими и отцовскими линиями по спектрам зеина, тем выше эффект гетерозиса у гибридов. Все гибриды, полученные с участием линии лопающейся кукурузы АГ96, являются высокогетерозисными. Более подробно характеристика местных сортов и новых линий лопающейся кукурузы по спектрам зеина представлена в нашей отдельной публикации (Sidorova et al., 2010b).

Белок δ -зеин имеет небольшой размер и состоит из 130 аминокислот. Богатые серосодержащими аминокислотными остатками полипептиды δ -зеина кодируются только двумя генами (Xu, Messing, 2009). δ -зеин характеризуется высоким содержанием метионина (23%). δ -зеин с $M_r \sim 18$ кДа отличается от δ -зеина с $M_r \sim 10$ кДа не только молекулярной массой, но и наличием часто повторяющейся богатой метионином вставки из 53 аминокислот в центральной части молекулы. В остальном аминокислотные последовательности очень похожи друг на друга (Woo et al. 2001). Компонент δ -зеина с $M_r \sim 18$ кДа в спектрах часто бывает скрыт компонентами близкой подвижности α -зеина с $M_r \sim 19$ кДа. Как правило, для δ -зеина характерно высокое содержание метионина, для γ -зеина – цистеина, тогда как β -зеин богат как цистеином, так и метионином. Из литературных источников известно, что высокий уровень экспрессии δ -зеина с $M_r \sim 10$ кДа повышает содержание метионина, но анализ белка инбредных линий В73 и Мо17 с помощью SDS-PAGE показывает, что повышение уровня метионина происходит за счет цистеина, присутствующего в β - и γ -зеине. В результате происходит снижение интенсивности проявления компонентов β - и γ -зеина (Wu et al., 2012). Ана-

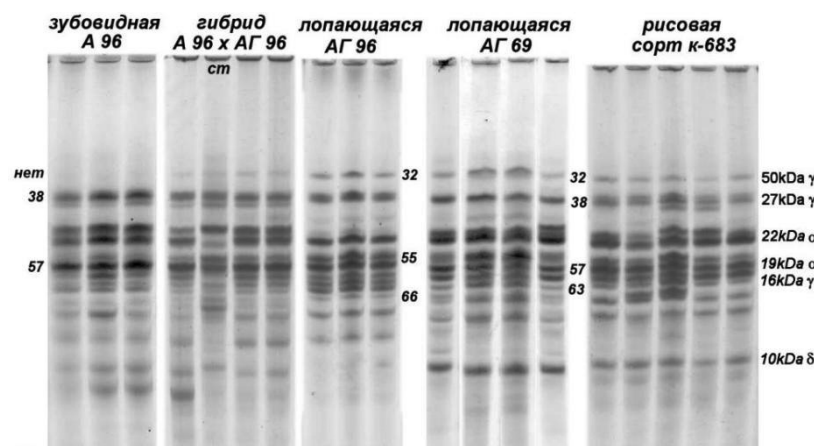


Рис. 11. Электрофоретические спектры зеина исходных линий зубовидной кукурузы и новых селекционных линий, а также сортов лопающейся кукурузы (компонент в позиции 32 – маркер лопающейся кукурузы; стандарт (ст) – инбредная линия «F2»)

Fig. 11. Zein electrophoretic patterns of the original dent corn lines and new breeding lines, and popcorn cultivars (the component in position 32 is a popcorn marker; standard reference (ст): inbred line “F2”)

логичные данные получены нами для тех же инбредных линий при электрофорезе в PAG в кислом буфере (рис. 12). Согласно номенклатуре зеина после электрофореза в PAG в кислом буфере, принятой в ВИР, позиция полипептида δ -зеина с $M_r \sim 10$ кДа совпадает с компонентами быстрой подвижности (позиции 85 и 86 в спектрах). В спектрах инбредной линии В73 δ -зеин с $M_r \sim 10$ кДа (позиция 86) проявляется интенсивно, γ -зеин с $M_r \sim 27$ кДа представлен одним слабым компонентом, а γ -зеин с $M_r \sim 16$ кДа отсутствует (нет компонента в позиции 63). Напротив, у линии Мо17 δ -зеин 10 кДа очень слабой интенсивности (позиция 86), при этом γ -зеин с $M_r \sim 27$ кДа (позиции 39 и 40) и γ -зеин с $M_r \sim 16$ кДа (позиция 63) хорошо проявляются. То же самое можно наблюдать в спектрах для компонентов β -зеина с $M_r \sim 15$ кДа. У линии В73 его нет, а у линии Мо17 β -зеин с $M_r \sim 15$ кДа (позиция 66) хорошо проявляется. Таким образом, эти компоненты спектра зеина, полученные электрофорезом в PAG в кислом буфере, очевидно соответствуют компонентам β - и δ -зеинов, согласно номенклатуре, разработанной для SDS-PAGE.

что отбор образцов с высоким содержанием метионина из популяций кукурузы, по-видимому, приводит к низкому уровню накопления богатого цистеином γ -зеина с $M_r \sim 27$ кДа (Newell et al., 2014). Эти результаты позволили авторам предположить, что увеличение запаса метионина требует увеличенного поступления восстановленных форм серы от цистеина к метионину, тем самым уменьшая накопление γ -зеина с $M_r \sim 27$ кДа.

Следуя данным по накоплению δ -зеина с $M_r \sim 10$ кДа, полученным из литературных источников, мы подобрали инбредные линии, электрофоретические спектры которых контрастно отличались по интенсивности проявления компонентов в позициях 85 и 86, соответствующих полипептидам, богатым метионином (рис. 13).

На рисунке 13 показана разная интенсивность проявления δ -зеина с $M_r \sim 10$ кДа (соответствует компонентам в позициях 85 и 86). Аналогичные результаты были получены при использовании значительной подборки инбредных линий. В левой части рисунка представлены спектры линий, в которых интенсивно проявляется δ -зеин с $M_r \sim 10$ кДа, в правой – спектры линий, в которых он

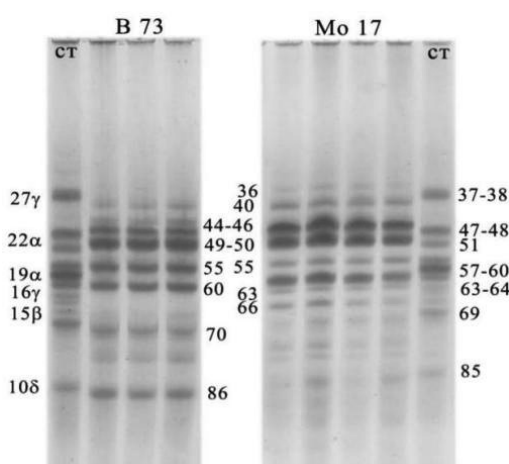


Рис. 12. Демонстрация накопления метионина и цистеина в зерне по интенсивности проявления (окрашивания) компонентов электрофоретических спектров зеина инбредных линий В73 и Мо17 (цифрами обозначены позиции компонентов в спектрах зеина после электрофореза в PAG в кислом буфере; стандарт (ст) – инбредная линия «F2»)

Fig. 12. Demonstration of methionine and cysteine accumulation in grain by the intensity of manifestation (staining) of zein electrophoretic pattern components in inbred lines B73 and Mo17 (the numbers indicate the positions of the components in zein patterns after electrophoresis in PAG in an acidic buffer; standard reference (ст): inbred line "F2")

У разных инбредных линий кукурузы полипептиды δ -зеина после SDS-PAGE оказались сходными по подвижности, однако имели разную интенсивность окрашивания, что указывало на варьирование в содержании метионина, вплоть до его отсутствия у некоторых линий (Wu et al., 2012; Wu, Messing, 2014). Изменение уровней метионина среди инбредных линий не дает видимого фенотипа. Однако содержание метионина может достигать достаточного уровня в некоторых сортах кукурузы, что исключает необходимость его добавок в корма животных (Messing, Fisher, 1991). Причина этого заключается в том, что минорные компоненты зеина β , γ и δ имеют высокую долю богатых серой аминокислот и их уровни могут варьировать среди сортов кукурузы. По нашим экспериментальным данным, высокий уровень метионина могут иметь сорта 'Schindelmeiser' (см. рис. 2) и 'Gloria Janetzis', в спектрах которых есть довольно интенсивные компоненты в позициях 85 и 86, соответствующие δ -зеину с $M_r \sim 10$ кДа. Недавние исследования показали,

очень слабый или отсутствует. В спектрах линий с интенсивным проявлением компонентов в позициях 85 и 86 (δ -зеин с $M_r \sim 10$ кДа) очень слабо проявляется и даже отсутствует компонент в позиции 38 (γ -зеин с $M_r \sim 27$ кДа). И наоборот, в спектрах линий со слабым проявлением или отсутствием компонентов в позициях 85 и 86 (δ -зеин с $M_r \sim 10$ кДа) компоненты в позициях 37 и 38 (γ -зеин с $M_r \sim 27$ кДа) проявляются интенсивно. Это еще раз показывает, что электрофорез зеина в PAG в кислом буфере имеет большие возможности для изучения ценных селекционных свойств кукурузы.

В результате сопоставления номенклатуры зеина после разделения его электрофорезом в PAG в кислом буфере с номенклатурой зеина после электрофореза в SDS-PAGE было показано, что выявленные нами маркеры раннеспелости, высокого качества белка, высоких технологических качеств лопающейся кукурузы и других ценных признаков совпадают со значимыми белковыми маркерами этих признаков в номенклатуре SDS-PAGE.

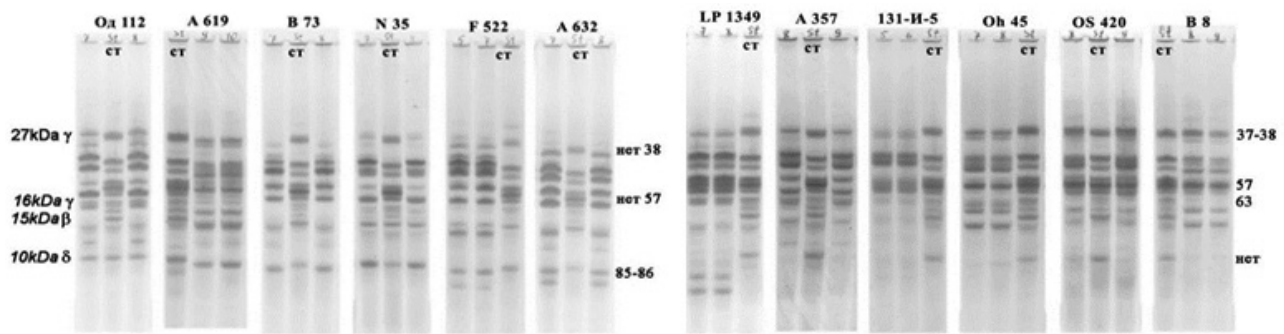


Рис. 13. Демонстрация накопления метионина и цистеина в зерне по интенсивности проявления (окрашивания) компонентов электрофоретических спектров инбредных линий кукурузы (цифрами обозначены позиции компонентов в спектрах зеина после электрофореза в PAG в кислом буфере; стандарт (СТ) – инбредная линия «F2»)

Fig. 13. Demonstration of methionine and cysteine accumulation in grain by the intensity of manifestation (staining) of zein electrophoretic pattern components in inbred maize lines (the numbers indicate the positions of the components in zein patterns after electrophoresis in PAG in an acidic buffer; standard reference (СТ): inbred line “F2”)

Заключение

Приведенные в статье результаты наглядно демонстрируют возможности белковых (зеиновых) маркеров в повышении эффективности гибридной (гетерозисной) селекции. Нами выявлены зеиновые маркеры взрываемости зерен кукурузы, маркеры раннеспелости, восковидности, а также маркеры, указывающие на высокое содержание метионина. Эффективность маркеров продемонстрирована на большом материале из коллекции ВИР, а также на селекционном материале, который был предоставлен нам ведущими селекционерами страны.

Кроме того, в рамках нашей работы было проведено сравнение номенклатуры зеина после разделения его электрофорезом в PAG в кислом буфере, принятой в ВИР, с номенклатурой зеина после SDS-PAGE, принятой зарубежными учеными. Полипептидам α-зеинов с Mг ~ 22 и 19 кДа, обычно наиболее распространенным в генотипах, в спектрах после электрофореза в PAG в кислом буфере соответствуют две наиболее интенсивно проявляющиеся зоны компонентов в позициях с 45 по 52 (Mг ~ 22 кДа) и с 53 по 61 (Mг ~ 19 кДа). В зоне компонентов α-зеина с Mг ~ 22 кДа нами был выявлен маркер восковидности, соответствующий компоненту 47. Полипептидам γ-зеинов с Mг ~ 27 кДа и 16 кДа соответствует комбинация компонентов «38–57», в которой нами определены белковые маркеры раннеспелости. Компоненты в позициях 57 и 63, в силу структурных особенностей этих белков, имеют более быструю подвижность в геле и скорее всего соответствуют γ-зеину с Mг ~ 16 кДа. γ-зеину с Mг ~ 50 кДа соответствует компонент в позиции 32, который при электрофорезе в PAG в кислом буфере определен как маркер лопающейся кукурузы. И наконец, δ-зеину с Mг ~ 10 кДа соответствуют компоненты в позициях 85 и 86, интенсивность проявления которых в спектрах связана с увеличением или уменьшением содержания метионина.

Многолетние исследования, проведенные в лаборатории биохимии и молекулярной биологии ВИР, показали, что сфера применения метода зеиновых маркеров очень широка. Зеиновые маркеры являются эффективными научными инструментами для идентификации и изучения поступающих в коллекцию ВИР новых образцов кукурузы; улучшения существующих инбредных линий; все-

стороннего семенного контроля (однородность, формирование желаемого генотипического состава, включение в селекционный материал хозяйственно ценных признаков и подбор родительских форм для получения высокого эффекта гетерозиса); наконец, для маркерного сопровождения всех этапов селекционного процесса.

References / Литература

- Coleman C.E., Larkins B.A. The prolamins of maize. In: P.R. Shewry, R. Casey (eds). *Seed Proteins*. New York, NY: Springer; 1999. p.109-139. DOI: 10.1007/978-94-011-4431-5_6
- Esen A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cereal Science*. 1987;5(2):117-128. DOI: 10.1016/S0733-5210(87)80015-2
- Feng L., Zhu J., Wang G., Tang Y., Chen H., Jin W. et al. Expression profiling study revealed unique expressional patterns and dramatic expressional divergence of maize α-zein super gene family. *Plant Molecular Biology*. 2009;69(6):649-659. DOI: 10.1007/s11103-008-9444-z
- Hake S., Ross-Ibarra J. Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. *eLife*. 2015;4:e05861. DOI: 10.7554/eLife.05861
- Holding D.R. Recent advances in the study of prolamins storage protein organization and function. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:276-284. DOI: 10.3389/fpls.2014.00276
- Holding D.R., Larkins B.A. Zein storage proteins. In: A.L. Kriz, B.A. Larkins (eds). *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. Berlin: Springer; 2009. p.269-286.
- International rules for seed testing. Rules 1996. Verification of species and cultivar. *Seed Science and Technology*. 1996;24 Suppl:253-270.
- Kerv Yu.A., Sidorova V.V. Analysis and registration of maize lines, varieties and hybrids by zein electrophoresis technique (guidelines). St. Petersburg, VIR; 2018. [in Russian] (Керв Ю.А., Сидорова В.В. Анализ и регистрация линий, сортов и гибридов кукурузы методом электрофореза зеина (методические указания). Санкт-Петербург: ВИР; 2018). DOI: 10.30901/978-5-905954-80-1
- Khan N. U., Sheteiw M., Lihua N., Khan M.M.U., Han Z. An update on the maize zein-gene family in the post-genomics era. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2019;1:13. DOI: 10.1186/s43014-019-0012-5

- Kodrzycki R., Boston R.S., Larkins B.A. The opaque-2 mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell*. 1989;1(1):105-114. DOI: 10.1105/tpc.1.1.105
- Konarev A.V. Adaptive nature of molecular polymorphism and its use in solving problems of plant genetic resources and breeding (Adaptivny kharakter molekulyarnogo polimorfizma i yego ispolzovaniye v reshenii problem geneticheskikh resursov rasteniy i selektsii). *Agrarian Russia*. 2002;(3):4-11. [in Russian] (Конарев А.В. Адаптивный характер молекулярного полиморфизма и его использование в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции. *Аграрная Россия*. 2002;(3):4-11).
- Konarev V.G. Identification of varieties and registration of the gene pool of cultivated plants by seed proteins (Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kulturnykh rasteniy po belkam semyan). St. Petersburg; 2000. [in Russian] (Конарев В.Г. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. Санкт-Петербург; 2000).
- Konarev V.G., Gavrilyuk I.P., Gubareva N.K. Protein markers of the genomes of wheat and their wild relatives. I. Immunochemical analysis of soluble proteins in the grain of wheat and *Aegilops* (Belkovye markery genomov pshenits i ikh dikikh sorodichey. I. Immunokhimicheskiy analiz rastvorimyykh belkov zerna pshenits i egilopsov). *Vestnik selskokhozyaystvennoy nauki = Bulletin of Agricultural Science*. 1970;(8):100-108. [in Russian] (Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. Белковые маркеры геномов пшениц и их диких сородичей. I. Иммунохимический анализ растворимых белков зерна пшениц и эгилопсов. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1970а;(8):100-108).
- Konarev V.G., Gavrilyuk I.P., Gubareva N.K. Protein markers of the genomes of wheat and their wild relatives. II. Comparative electrophoretic analysis of gliadins ((Belkovye markery genomov pshenits i ikh dikikh sorodichey. II. Sravnitelny elektroforeticheskiy analiz gliadinov). *Vestnik selskokhozyaystvennoy nauki = Bulletin of Agricultural Science*. 1970b;(8):109-114. [in Russian] (Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. Белковые маркеры геномов пшениц и их диких сородичей. II. Сравнительный электрофоретический анализ глиадинов. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1970b;(8):109-114).
- Konarev V.G., Sidorova V.V., Timofeeva G.I. Zein electrophoresis as a method of identification, registration and analysis of maize varieties, lines and hybrids (Elektroforez zeina kak metod identifikatsii, registratsii i analiza sortov, liniy i gibridov kukuruzy). *Agricultural Biology*. 1990;25(3):167-177. [in Russian] (Конарев В.Г. Сидорова В.В., Тимофеева Г.И. Электрофорез зеина как метод идентификации, регистрации и анализа сортов, линий и гибридов кукурузы. *Сельскохозяйственная биология*. 1990;25(3):167-177).
- Lending C.R., Larkins B.A. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *Plant Cell*. 1989;1(10):1011-1023. DOI: 10.1105/tpc.1.10.1011
- Liu C.N., Rubenstein I. Genomic organization of an alpha-zein gene cluster in maize. *Molecular and General Genetics*. 1992;231(2):304-312. DOI: 10.1007/BF00279804
- Matveeva G.V., Sidorova V.V., Kerv Yu.A., Konarev A.V. Identification of old local varieties and breeding lines of waxy corn for spectra of zein. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(7):27-30. [in Russian] (Матвеева Г.В., Сидорова В.В., Керв Ю.А., Конарев А.В. Идентификация стародавних местных сортов и селекционных линий восковидной кукурузы по спектрам зеина. *Достижения науки и техники АПК*. 2015;29(7):27-30).
- Messing J., Fisher H. Maternal effect on high methionine levels in hybrid corn. *Journal of Biotechnology*. 1991;21(3):229-237. DOI: 10.1016/0168-1656(91)90044-V
- Mikov S.V. Using exotic material to create new lines of maize (Ispolzovaniye ekzoticheskogo materiala dlya sozdaniya novykh liniy kukuruzy). In: *Collection of scientific works of young scientists. Vol. 5 (Sbornik nauchnykh trudov molodykh uchenykh. T. 5)*. Krasnodar: KNIISKH; 2002. p.22-27. [in Russian] (Миков С.В. Использование экзотического материала для создания новых линий кукурузы. В кн.: *Сборник научных трудов молодых ученых. Т. 5*. Краснодар: КНИИСХ; 2002. С.22-27).
- Newell M.A., Vogel K.E., Adams M., Aydin N., Bodnar A. L., Ali M. et al. Genetic and biochemical differences in populations bred for extremes in maize grain methionine concentration. *BMC Plant Biology*. 2014;14:49-61. DOI: 10.1186/1471-2229-14-49
- Orlovskaya O.A., Kubrak S.V., Vakula S.I., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. Marker-assisted identification of maize genotypes with improved protein quality. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(3):333-338. [in Russian] (Орловская О.А., Кубрак С.В., Вакула С.И., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. Маркер-контролируемое выявление генотипов кукурузы с улучшенным качеством белка. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(3):333-338). DOI: 10.18699/VJ15.043
- Phillips R.L., Suresh J., Olsen M., Krone T. Registration of high-methionine versions of maize inbreds A632, B73, and Mo17. *Journal of Plant Registrations*. 2008;2(3):243-245. DOI: 10.3198/jpr2007.11.0657crg
- Pomortsev A.A., Kudryavtsev A.M., Upelnik V.V., Konarev V.G., Konarev A.V., Gavrilyuk I.P., Gubareva N.K., Peneva T.I., Sidorova V.V., Farber S.P., Berezkin A.P., Malko A.M., Smirnova L.A., Bunin M.S., Kononkov P.F., Gins V.K., Startsev V.I., Dobrutskaya E.G. Methodology for laboratory varietal control by groups of agricultural plants (Metodika provedeniya laboratornogo sortovogo kontrolya po gruppam selskokhozyaystvennykh rasteniy). Moscow: Rosinformagrotekh; 2004. [in Russian] (Поморцев А.А., Кудрявцев А.М., Упелник В.В., Конарев В.Г., Конарев А.В., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К., Пенева Т.И., Сидорова В.В., Фарбер С.П., Березкин А.П., Малько А.М., Смирнова Л.А., Бунин М.С., Коненков П.Ф., Гинс В.К., Старцев В.И., Добруцкая Е.Г. Методика проведения лабораторного сортового контроля по группам сельскохозяйственных растений. Москва: Росинформагротех; 2004).
- Shmaraev G.E. Utilization of the world genofond of maize for the investigations into breeding and genetics. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1986;105:3-10. [in Russian] (Шмараев Г.Е. Использование мирового генофонда кукурузы в селекционно-генетических исследованиях. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1986;105:3-10).
- Shmaraev G.E. Varietal and genetic diversity of corn (maize) – valuable initial material for breeding. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1983;80:54-64. [in Russian] (Шмараев Г.Е. Сортовое и генетическое разнообразие кукурузы – ценный исходный материал для селекции. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1983;80:54-64).
- Sidorova V.V., Kerv Yu.A., Matveeva G.V., Konarev A.V. Prospects of using zein markers in breeding waxy maize lines and varieties. *Proceedings on Applied Botany, Genetics*

- and Breeding*. 2018;179(3):240-249. [in Russian] (Сидорова В.В., Керв Ю.А., Матвеева Г.В., Конарев А.В. Перспективы использования зеиновых маркеров в селекции линий и сортов восковидного подвита кукурузы. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2018;179(3):240-249). DOI: 10.30901/2227-8834-2018-3-240-249
- Sidorova V.V., Konarev A.V., Kerv Yu.A., Matveeva G.V. Protein markers in the analysis of a genetic variety selections, and the corn seed control. *Agrarian Russia*. 2015;(12):2-10. [in Russian] (Сидорова В.В., Конарев А.В., Керв Ю.А., Матвеева Г.В. Белковые маркеры в анализе генетического разнообразия, селекции и семенном контроле кукурузы. *Аграрная Россия*. 2015;(12):2-10). DOI: 10.30906/1999-5636-2015-12-2-10
- Sidorova V.V., Konarev A.V., Matveeva G.V., Timofeeva G.I. Using the electrophoretic spectrum of zein to predict heterosis in maize (Ispolzovaniye elektroforeticheskogo spektra zeina dlya prognozirovaniya geterozisa u kukuruzy). *Agrarian Russia*. 2004;(6):34-41. [in Russian] (Сидорова В.В., Конарев А.В., Матвеева Г.В., Тимофеева Г.И. Использование электрофоретического спектра зеина для прогнозирования гетерозиса у кукурузы. *Аграрная Россия*. 2004;(6):34-41).
- Sidorova V.V., Matveeva G.V., Kerv Yu.A., Konarev A.V. Possibilities of zein markers in maize heterosis breeding improving. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2012;170:147-157. [in Russian] (Сидорова В.В., Матвеева Г.В., Керв Ю.А., Конарев А.В. Возможности использования зеиновых маркеров в повышении эффективности гетерозисной селекции кукурузы. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2012;170:147-157).
- Sidorova V.V., Matveeva G.V., Konarev A.V. Study of teosinte and its natural hybrid with corn on zein spectra. *Agrarian Russia*. 2010a;(2):13-15. [in Russian] (Сидорова В.В., Матвеева Г.В., Конарев А.В. Изучение дикорастущего сородича кукурузы теосинте и его естественного гибрида с кукурузой по спектрам зеина. *Аграрная Россия*. 2010a;(2):13-15). DOI: 10.30906/1999-5636-2010-2-13-15
- Sidorova V.V., Matveeva G.V., Konarev A.V., Yankovskii N.K. The characteristic of local varieties and new lines of a bursting corn on zein spectra. *Agrarian Russia*. 2010b;(3):6-10. [in Russian] (Сидорова В.В., Матвеева Г.В., Конарев А.В., Янковский Н.К. Характеристика местных сортов и новых линий лопающейся кукурузы по спектрам зеина. *Аграрная Россия*. 2010b;(3):6-10).
- Sidorova V.V., Timofeeva G.I., Konarev V.G. Identification and registration of corn varieties, lines and hybrids using zein electrophoresis methods. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1987;114:61-75. [in Russian] (Сидорова В.В., Тимофеева Г.И., Конарев В.Г. Идентификация и регистрация сортов, линий и гибридов кукурузы методами электрофореза зеина. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1987;114:61-75).
- Tarakanov P.S., Chmeleva Z.V. Biochemical evaluation of the kernel quality of exotic races of maize from Latin America countries. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1986;105:58-66. [in Russian] (Тараканов П.С., Чмелева З.В. Биохимическая оценка качества зерна экзотических рас кукурузы из стран Латинской Америки. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1986;105:58-66).
- Thompson G.A., Larkins B.A. Characterization of zein genes and their regulation in maize endosperm. In: M. Freeling, V. Walbot (eds). *The Maize Handbook*. New York, NY: Springer; 1994. p.117:639-647.
- Troyer A.F. Development of hybrid corn and the seed corn industry. In: J.L. Bennetzen, S. Hake (eds). *Maize Handbook. Genetics and Genomics*. New York, NY: Springer; 2009. p.87-114. DOI: 10.1007/978-0-387-77863-1_5
- Wang S.Z., Esen A. Primary structure of a proline-rich zein and its cDNA. *Plant Physiology*. 1986;81(1):70-74. DOI: 10.1104/pp.81.1.70
- Wilson C.M. A nomenclature for zein polypeptides based on isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*. 1985;62(5):361-365.
- Wilson C.M. Serial analysis of zein by isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Plant Physiology*. 1986;82(1):196-202. DOI: 10.1104/pp.82.1.196
- Woo Y.M., Hu D.W., Larkins B.A., Jung R. Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. *Plant Cell*. 2001;13(10):2297-2317. DOI: 10.1105/tpc.010240j
- Wu Y., Messing J. Proteome balancing of the maize seed for higher nutritional value. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:240. DOI org/10.3389/fpls.2014.00240
- Wu Y., Wang W., Messing J. Balancing of sulfur storage in maize seed. *BMC Plant Biology*. 2012;12:77-85. DOI: 10.1186/1471-2229-12-77
- Xu J.H., Messing J. Amplification of prolamin storage protein genes in different subfamilies of the Poaceae. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009;119(8):1397-1412. DOI: 10.1007/s00122-009-1143-x

Информация об авторах

Валерия Васильевна Сидорова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, sidorova42@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5233-8949>

Алексей Васильевич Конарев, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, a.konarev@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2938-1014>

Юлия Андреевна Керв, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, kerv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3728-6968>

Information about the authors

Valeriya V. Sidorova, Cand. Sci (Biology), Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, sidorova42@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5233-8949>

Alexey V. Konarev, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, Head of a Department, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, a.konarev@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2938-1014>

Yulia A. Kerv, Cand. Sci. (Biology), Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, kerv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3728-6968>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 11.07.2022; одобрена после рецензирования 30.03.2023; принята к публикации 01.06.2023
The article was submitted on 11.07.2022; approved after reviewing on 30.03.2023; accepted for publication on 01.06.2023.