

УДК 633.15:575.1(043.3)

*О. С. Радовня, Т. А. Луполов, М. С. Мелихова***ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ГИБРИДНОСТИ СЕМЯН КУКУРУЗЫ
ЗАРУБЕЖНОЙ СЕЛЕКЦИИ**

В статье экспериментально изучены гибриды кукурузы зарубежной селекции. Методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле были получены электрофореграммы с последующей их расшифровкой, а также рассчитан уровень гибридности исследуемых образцов.

Введение

Работа по созданию, оценке и систематизации исходного материала в селекции кукурузы требует больших экономических затрат и времени. На фоне мировых усилий в этом направлении, связанных с международной кооперацией и специализацией стран-участниц CIMMYT, IEARDA, EUCARPIA и других организаций, в Беларуси эта работа сдерживается снижением финансирования селекции, разрушением традиционных координаций работ по линии ВИР, ВНИИ кукурузы и др. Вместе с тем приток различной зародышевой плазмы, в частности по каналам международных соглашений, требует мер по систематизации материала, по созданию и оценке нового исходного материала, а также осуществления селекционных программ на основе генетико-статистической идентификации элитного и экзотического генофонда. Значительное количество линейного и гибридного материала зачастую с неизвестной или искаженной родословной требует оценки множества тестерных гибридов, что достаточно затруднительно.

В связи с этим существенное значение приобретает разработка методов идентификации линий, а также методов поддержания их на высоком уровне генетической стабильности [1].

В связи с сокращением объёмов применения удобрений и средств защиты растений высокий урожай зерна и силосной массы кукурузы обеспечиваются за счёт высококачественных семян районированных гибридов и сортов. Многолетняя практика товарного семеноводства кукурузы свидетельствует, что типичность материнских линий в большинстве случаев не соответствует необходимым требованиям. Установлено, что среди растений материнской линии, кроме стерильных, присутствуют фертильные растения F_1 соответствующего гибрида, что влияет на качество семян первого поколения. Однако основной процесс – создание высокопродуктивных гибридных комбинаций, особенно при двойном и более сложном скрещиваниях – остаётся ещё очень громоздким и малоэффективным. Главная причина такого положения кроется в недостаточной изученности генетических основ самоопыленных линий [2].

В настоящее время новым направлением в работе агрохимических служб стало освоение метода электрофореза белков кукурузы для определения генетической чистоты самоопыленных линий и уровня гибридности семян первого поколения простых, трёхлинейных и некоторых двойных и межлинейных гибридов [3], [4].

По особенностям компонентного состава родительских форм этот метод позволяет в гибридных партиях легко выявить наличие семян от самоопыления и опыления инородной пылью. Белок рассматривается как конечный продукт функционирования определённого структурного гена. Изменение нуклеотидного состава гена часто приводит к изменению кодируемого им белка. У перекрёстников и самоопылителей при промышленном использовании гибридных семян кодоминантный характер наследования индивидуальных белков имеет большое практическое значение. Одновременное присутствие в суммарном белке семени F_1 , характерных для материнской и отцовской форм белков, рассматривается как доказательство их гибридности [5].

Метод электрофореза зеина кукурузы используется для определения типичности самоопылённых линий и уровня гибридности гибридов первого поколения. Именно этот белок имеет ряд преимуществ перед другими ферментами: большая концентрация его в зерновке и семянке, лёгкость извлечения, гетерогенность зеина (до 22 компонентов, т. е. до 22 генов). Такая методика характеризуется высокой разрешающей способностью и воспроизводимостью, а также простотой проведения массовых анализов [6].

Важным фактором получения высокого урожая гибридных семян является использование хорошего посевного материала, поэтому хозяйствам, занимающимся их выращиванием,

нужно знать типичность родительских линий, а для производства товарного зерна – уровень гибридности. Определением данных показателей занимается аккредитованная 31 марта 2008 г. лаборатория электрофореза РНДУП «Полесский институт растениеводства», услугами которой пользуются хозяйства Гомельской и соседних областей, научные учреждения.

В условиях рыночной экономики, когда семенной материал поступает из разных регионов, метод электрофореза очень удобен для идентификации семян товарных посевов. Выращивание кукурузы на зерно может сыграть стабилизирующую роль в производстве зернофуража, поскольку в неблагоприятные для зерновых годы, когда они в ранние фазы подвержены засухе, урожайность кукурузы получается высокой, и наоборот, когда май–июнь холодные и влажные. Есть и другие достоинства при выращивании кукурузы на зерно: возможность длительной уборки без потерь (до одного месяца), отсутствие полегания на высоком фоне плодородия или заправки удобрениями и т. д. [7].

Естественно, урожайность и уровень гибридности семян зависят не только от посевного материала, но и от антропогенных субсидий в виде минеральных удобрений.

Таким образом, **целью нашего исследования** явилось определение уровня гибридности семян кукурузы зарубежной селекции.

Материалы и методы исследований. Исследованию подверглись гибриды кукурузы зарубежной селекции: Адонис 180 СВ, МЕЛ 272 МВ, МОС 182 СВ, Немо 216 СВ, полученные из следующих организаций: ЧУП «Автюки», к-з СПК «50 лет БССР», филиал «Дудичи», РСУП э/б «Липово». Выбор этих гибридов был обусловлен их высокой технологичностью, устойчивостью к загущению посевов, для них характерно ускоренное высыхание зерна при созревании, ремонтантность семеноводства.

Анализируемые гибриды обладают следующими характеристиками:

Адонис 180 СВ – двойной межлинейный гибрид белорусско-русской селекции, ФАО 230 занесён в Госреестр в 2004 году для использования на силос, средняя урожайность – 220 ц/га, вегетационный период – 114 дней, а высота растения – 258 см, содержание сухого вещества – 31,6%.

МЕЛ 272 МВ – двойной межлинейный гибрид кукурузы белорусско-украинской селекции, ФАО 240, занесён в Госреестр в 2005 году для использования на силос, средняя урожайность – 226 ц/га, вегетационный период – 126 дней, а высота растения – 236 см, содержания сухого вещества 32,5%.

МОС 182 СВ – двойной межлинейный гибрид белорусско-украинской селекции, ФАО 187, занесён в Госреестр в 2006 году для использования на силос, средняя урожайность – 213 ц/га, вегетационный период – 114 дней, а высота растения – 238 см, содержание сухого вещества 31,2%.

Немо 216 СВ – двойной межлинейный гибрид кукурузы белорусско-русской селекции, ФАО 180, занесён в Госреестр в 1998 году для использования на силос, средняя урожайность – 236 ц/га, вегетационный период – 107 дней, а высота растения – 247 см, содержание сухого вещества – 33,9%.

Исследования проводились на базе лаборатории электрофореза Полесского филиала РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» методом вертикального электрофореза в полиакриломидном геле (ГОСТ 27025).

Для успешного проведения биохимического анализа на типичность и гибридность необходимо правильно составить средние образцы початков и корзинок. Для этого в равномерно распределённых пунктах по диагонали поля в 20 точках отбирают из каждого ряда материнской формы не менее 100 початков или корзинок. Из каждого початка вылушивают 2 ряда зёрен от верхушки до основания, а из корзинок – из двух противоположных секторов, исключая краевые на 1,0–1,5 см, далее перемешивают отдельно зерновки, семянки и составляют по 2 усреднённых образца массой по 1 кг. Продолжительность электрофореза в кислой среде при напряжении 500 В составляет 3–5 ч. Полученные на гелевых пластинках электрофоретические спектры зеина кукурузы сравнивают с эталонными. Подсчёт результатов электрофореза кукурузы проводят по ОСТ 10003–93 «Семена кукурузы».

Определение наследственно-обусловленного белка – зеина – в семенах кукурузы проводилось методом электрофоретического разделения белка в геле и включало в себя ряд этапов:

1. Приготовление раствора для экстракции.
2. Приготовление раствора для растворения сухих белков.
3. Приготовление раствора акриламида концентрацией 40,0 см³.
4. Приготовление инициатора полимеризации – раствора сернокислого закисного железа концентрацией 1 г/см³.
5. Приготовление катализатора – раствора персульфата калия концентрацией 29,6 г/см³.
6. Приготовление электродного буфера.

7. Приготовление раствора для фиксации и окрашивания пластин геля.
8. Приготовление маркеров краски на основе пиронина G.
9. Приготовление белка.
10. Приготовление и формирование геля.
11. Электрофорез.

Продолжительность анализа определяют, ориентируясь на движение окрашенного фронта маркерного красителя. Отмечают время достижения маркерным красителем края гелевой пластины и повторно вносят в крайний карман пластины 0,1 см³ красителя. Анализ проводят до тех пор, пока окрашенный фронт маркерного красителя не достигнет края гелевой пластины во второй раз. Общая продолжительность анализа составляет примерно 5 ч.

При увеличении температурных параметров окружающей среды вышеустановленных показателей для исключения перегрева прибора уменьшается напряжение до 450 В.

После завершения электрофореза сначала отключают источник постоянного тока, затем прибор от самого источника, сливают в мойку электродный буфер и сосуд вместе с прибором заполняют холодной водопроводной водой для охлаждения и ополаскивания. Затем вынимают стенки с гелевой пластиной. Шпателем аккуратно разнимают стеклянные пластины и извлекают гелевую пластину, которую помещают в пластмассовую коробку, предварительно заполненную на 2 см по высоте раствором для фиксации и окрашивания.

Продолжительность окрашивания гелевых пластин при свежеприготовленном растворе – не менее 2 ч. При последующем использовании раствора время окрашивания увеличивается. После 8–10-кратного употребления необходимо приготовить свежий раствор.

После окрашивания гелевых пластин окрашивающий раствор сливают в специальный сосуд. Для полного удаления излишней краски гель на 24 ч помещают в водопроводную воду.

Полученный на гелевой пластине электрофоретический спектр зеина каждого анализируемого семени сравнивают эталонным спектром соответствующей самоопыленной линии.

Эталонный спектр, составленный на основе сравнительного изучения зеина всех основных форм кукурузы и её эндоспермальных мутантов, имеет следующий вид компонентного состава, который можно проследить в таблице № 1.

Таблица 1 – Интерпретация эталонного спектра зеина кукурузы (Ю. А. Асыка)

Группа	Компонентный состав электрофоретического спектра зеина
I	1, 2, 3, 4, 5, 6
II	1, 2, 3, 4
III	1, 2, 3, 4, 5

Структура электрофоретического спектра зеина по сортам и подвидам кукурузы изменяется, главным образом, за счёт компонентного состава I, III групп.

Наиболее стабильная II группа в количественном отношении является также преобладающей.

На основании 3-х групп и целостности их компонентного состава выделяют следующие виды спектра: мономорфный, диморфный и полиморфный.

Гибридность определяется присутствием как минимум одного маркерного компонента отцовской формы, которая отсутствует в спектре зеина материнской формы.

Уровень гибридности семян первого поколения УГ₁, %, определяется по формуле (1):

$$УГ_1 = (\Gamma \times 100) / П, \quad (1)$$

где Γ – число гибридных зёрен, шт.;

$П$ – количество анализируемых зерновок, шт.

Уровень гибридности семян трехлинейных и двойных гибридов УГ₂, %, определяется по формуле (2):

$$УГ_2 = ((П - 4М) / П) \times 100, \quad (2)$$

где $М$ – количество типов спектров, идентичных самоопыленной линии материнского гибрида, который отличается от отцовской формы отсутствием компонента в данной зоне спектра, шт.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведённый электрофоретический анализ белка – зеина – исследуемых образцов, относящихся к разным гетерозисным группам, позволил получить электрофореграммы всех анализируемых партий гибридов.

На рисунке 1 представлены электрофореграммы гибридов Адонис 180 СВ, МЕЛ 272 МВ, МОС 182 СВ, Немо 216 СВ.

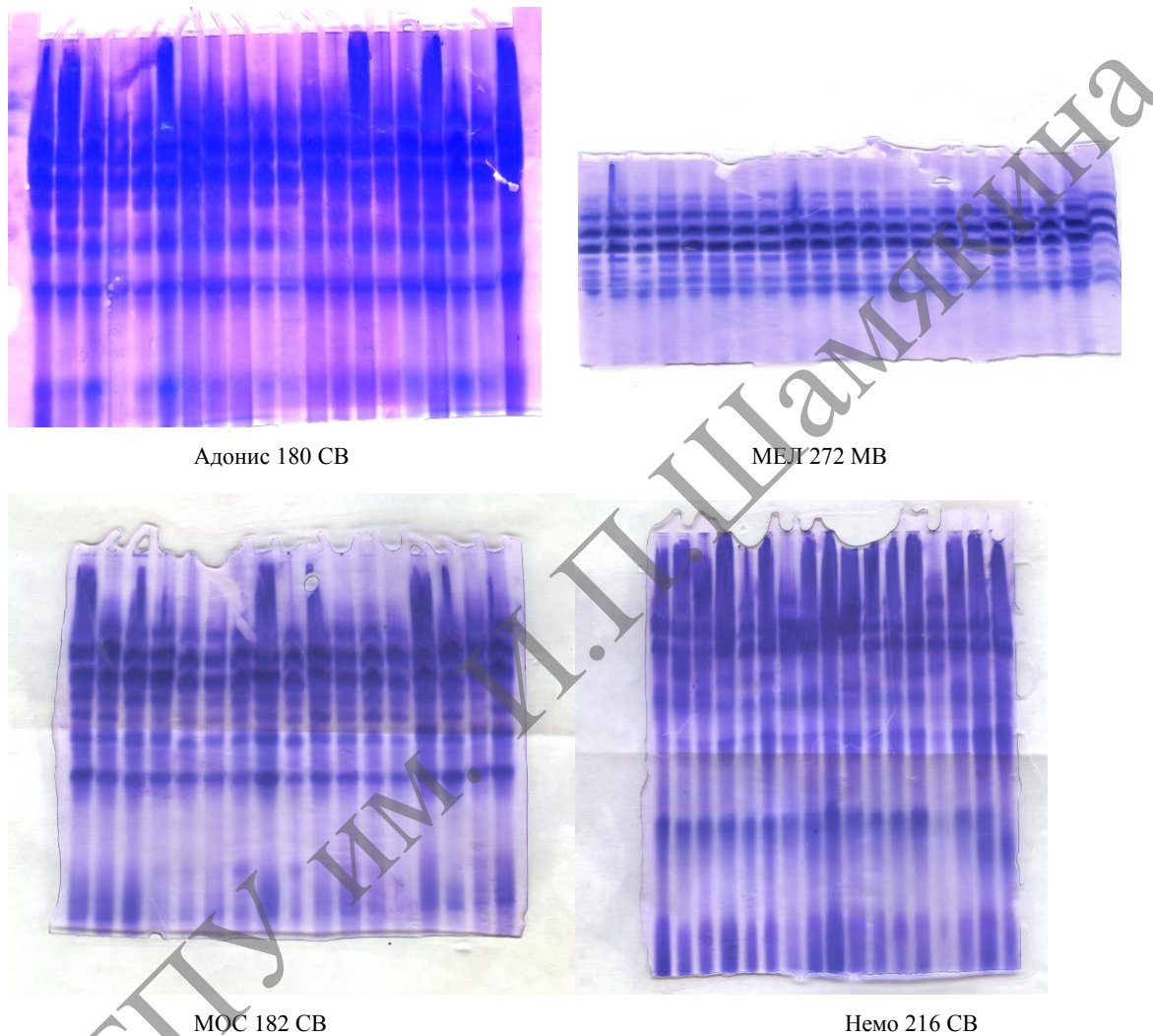


Рисунок 1 – Электрофореграммы гибридов
Адонис 180 СВ, МЕЛ 272 МВ, МОС 182 СВ, Немо 216 СВ

Используя данные расшифровки белка в электрофоретическом спектре и белковые формулы, нами был определен уровень гибридности, который представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Уровень гибридности семян кукурузы зарубежной селекции

№	Организация	Название сорта, гибрида	Уровень гибридности, %	Год урожая
1	ЧУП «Автюки»	МЕЛ 272 МВ	96	2008
2	К-з СПК «50 лет БССР»	Адонис 180 СВ	96	2008
3	Филиал «Дудичи»	МОС 182 СВ	96	2008
4	РСУП э/б «Липово»	Немо 216 СВ	96	2008
		МОС 182 СВ	96	2008
		МЕЛ 272 МВ	96	2008

Как видно из таблицы, уровень гибридности анализируемого материала составил 96%. Это свидетельствует о достаточно высоком уровне гибридности семян в исследуемых партиях. Это также подтверждается содержанием негибридных семян в объемной пробе (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты исследования по установлению негибридных семян

Гибриды	Количество семян, имеющих негибридную природу в выборке	Содержание негибридных семян в первоначальной объемной пробе, %
Адонис 180 СВ	9	18
МОС 182 СВ	1	2
МЕЛ 272 СВ	0	0,0
Немо 216 СВ	4	8

Как видно из таблицы, содержание негибридных семян в первоначальной объемной пробе составило 0–18%.

Выводы

Таким образом, в исследуемых партиях кукурузы установлен высокий уровень гибридности семян – 96%.

Литература

1. Надточаев, Н. Ф. Кукуруза на полях Беларуси / Н. Ф. Надточаев ; Науч.-практ. центр НАН Беларуси по земледелию. – Минск : ИВЦ Минфина, 2008. – 412 с.
2. Кобелева, Э. Н. Классификация самоопыленных линий по фенотипу / Э. Н. Кобелева, Ю. К. Кобелев // Кукуруза. – 1970. – № 3. – С. 19–21.
3. Определение гибридности семян кукурузы по электрофоретическим спектрам зерна / Ф. А. Попереля [и др.] // Доклады ВАСХНИЛ. – 1989. – № 3. – С. 2–4.
4. Конарев, В. Г. Электрофорез зерна как метод идентификации, регистрации и анализа сортов, линий и гибридов кукурузы / В. Г. Конарев, В. В. Сидорова, Г. И. Тимофеева // С.-х. биология. – 1990. – № 3. – С. 167–177.
5. Соколов, В. М. Использование качественных признаков для генотипических классификаций самоопыленных линий кукурузы / В. М. Соколов, Д. В. Гужва // Кукуруза и сорго. – 1997. – № 3. – С. 8–12.
6. Перуанский, Ю. В. Распознавание самоопыленных линий кукурузы / Ю. В. Перуанский, И. М. Савич // Доклады ВАСХНИЛ. – 1988. – № 2. – С. 11–13.
7. Федоров, В. А. Кукуруза: предшественник, обработка почвы / В. А. Федоров, В. А. Воронцов // Кукуруза и сорго. – 2000. – № 1. – С. 9–10.

Summary

The maize's hybrids of foreign selection were experimentally investigated in this work. Electrophoregrammes with the following decoding were obtained with the help of vertical electrophoresis method in a poliacrolamidal gel. Level of the investigated samples was calculated.

Поступила в редакцию 28.05.10.