

ПРИЛОЖЕНИЕ НА ФЕНОТИПНИ И БЕЛТЪЧНИ МАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА НА МУТАНТНИ ЛИНИИ ЦАРЕВИЦА И ТЕХНИТЕ ИЗХОДНИ ФОРМИ

МИМА ИЛЧОВСКА*¹, ЕЛЕНА ТОДОРОВСКА**¹, МИЛАДИН ГЕНОВ*, НИКОЛАЙ ХРИСТОВ**

*Институт по царевицата, Кнежа

**Агробиоинститут, София

¹E-mail: ilchovska_mima@abv.bg

Phenotype and Protein Markers for Assessment of Mutant Maize Inbreds and Their Progenitor Lines

M. Ilchovska*¹, E. Todorovska**¹, M. Guenov*, N. Christov**

*Maize Research Institute, Kneja, Bulgaria

**Agrobiointitute, Sofia, Bulgaria

Abstract

Phenotype assessment of 34 traits and acidic PAGE separation of zein polypeptides of 3 mutant inbreds and their 2 progenitor lines were performed to study the induced by mutagenesis genetic diversity in maize inbreds. The mutant lines showed large phenotype diversity and stable expression of many of the investigated traits. The latest can be used as reliable phenotype markers. The mutant lines FM 4662 and K 4640B differed for 17 and 20 traits respectively from the progenitor B73 while the phenotype difference of the mutant XM 87 136 from B 37 concerned 15 traits. In addition to the observed phenotype diversity the mutant inbreds showed differences in zein electrophoresis patterns. The inbred lines FM 4662 and XM 87 136 differed from their respective progenitor lines by 13 and 16 zein bands. Despite the observed substantial phenotype diversity between K 4640B and its progenitor line, the distinction of the zein patterns concerned only 2 bands. The observed polymorphisms in the zein electrophoretic patterns of the investigated lines are useful as additional markers for their identification, protection and for rapid seed lot purity tests.

Key words: maize, zein, electrophoresis, polymorphism, UPOV

Генофондът е от изключително голямо значение за ефективността на селекционно-генетичната дейност и в голяма степен определя резултатите от подборителната работа. Използването на експерименталния мутагенезис и мутационната селекция е една от възможностите за обогатяване и разширяване на генетичното разнообразие при царевицата. В Института по царевицата – Кнежа чрез физически и химически мутагенезис и последваща реципрочна мутационна селекция са създадени широк спектър от мутантни линии царевица, които се отличават от изходните по редица ясно изразени фенотипни характеристики и притежават ценни стопански качества – висока комбинативна способност, висок добив, високо съдържание на протеини и толерантност към засушаване (Генов, 1988; Христов, Христова, 1995). За оценка на генетичното разнообразие на тези линии се използват различни методи: фенологични, биометрични, електрофоретични, молекулярни и др. (Christov et al., 2004; Kostova et al., 2006).

В настоящето проучване е направена фенотипна характеристика и електрофореза на зеини в кисела PAGE на три мутантни линии с цел установяване на специфични маркери за тяхната идентификация.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За изследване на мутаген-индуцираното генетично разнообразие в инбредни линии царевица са включе-

ни мутантните линии: FM 4662, K 4640B, XM 87 136 и съответните им изходни форми B 73 и B 37. Линията FM 4662 е получена чрез ускорено стареене на семена от линия B 73 и последващото им облъчване с гама-лъчи, а K 4640B – чрез третиране на 2 – 3 cm кълнове на същата линия с 0,05% колхицин. Мутантната линия XM 87 136 е създадена чрез третиране на сухи семена от линия B 37 с 0,2% Диметилсулфат, 0,05% 1,4 Бисдиазоацетилбутан и 1% Диоксан. Видът и концентрациите на използваните мутагени са цитирани по Tomleкова (2010).

Фенологичните наблюдения и биометричните измервания на мутантните линии и техните изходни форми са проведени съгласно методиката за Различимост, Хомогенност и Стабилност (РХС) при царевицата (UPOV, 2009). За тази цел линиите са засявани и отглеждани в полски опити в продължение на 3 години (2008; 2009; 2010) като всяка година са отчитани 34 фенотипни показатели.

За определяне на електрофоретичния профил на резервните белтъци-зеини е използвана урее-но-ацетатна електрофореза в 10% ПААГ, предложена от Попореля и Асыка (1988). Екстракцията на зеини от царевичния ендосперм се извършва със 70% етанол, съдържащ 1% β-МЕ. Фракционирването на белтъците е проведено в ацетатен буфер (0,325M CH₃COOH; 0,1% глицин, рН 3,2 – 3,5) на 10% полиакриламиден гел (10% Т; 1,37 С), съдържащ 8M уреа, 0,325M CH₃COOH, 0,1% глицин. Бел-

Таблица 1. Резултати от фенологични наблюдения на линии царевица съгласно методиката на UPOV
Table 1. Results of phenotype observations of maize lines by the methodology of UPOV

№	Признаци	В 73		ФМ 4662		К 4640Б		В 37		ХМ 87 136	
1.	Първи лист - антоц. оцветяване на влагалището	3-5	слабо-средно	3-5	слабо-средно	3	слабо	1	липсва	3	слабо
2.	Първи лист - форма на върха	3	закръглена	4	закръг.-шпатул.	4	закръг.-шпатул.	3	закръглена	4	закръг.-шпатул.
3.	Лист - ъгъл между петурата и стъблото	3-5	малък-среден	1-3	мн. малък-малък	5	среден	5	среден	5	среден
4.	Лист - положение на петурата	3	леко извито	3	леко извито	5	извито	3	леко извито	5	извито
5.	Стъбло - степен на юиг-юаг	1	липсва	1	липсва	1	липсва	1	липсва	1	липсва
6.	Стъбло - антоц. оцветяване на въздушните корени	3	слабо	1	липсва	3	слабо	3	слабо	3	слабо
7.	Метлица - време на поява на тичинките	8	късно-мн. късно	7	късно	6	ср. късно-късно	7	късно	6	ср. късно-късно
8.	Метлица - антоц. оцветяване на основата на плевата	1	липсва	1	липсва	1	липсва	1	липсва	1	липсва
9.	Метлица - антоц. оцветяване на плевите	1	липсва	1	липсва	3-5	слабо-средно	1	липсва	3-5	слабо-средно
10.	Метлица - антоц. оцветяване на прашниците	1	липсва	1	липсва	3	слабо	3	слабо	3	слабо
11.	Метлица - гъстота на класчетата	3-5	рядка-средна	7	гъста	5	средна	5	средна	5	средна
12.	Метлица - ъгъл между гл. ос и страничните разклонения	3	малък	3-5	малък-среден	5	среден	5	среден	5	среден
13.	Метлица - положение на страничните разклонения	1-3	изпр.-леко извито	1	изправено	5	извито	1	изправено	5	извито
14.	Метлица - брой на първичните странични разклонения	5	средно	7	много	3-5	малко-средно	3-5	малко-средно	3-5	малко-средно
15.	Кочан - време на поява на свилата	8	късно-мн. късно	7	късно	5-6	средно-ср. късно	7	късно	5-6	средно-ср. късно
16.	Кочан - антоц. оцветяване на свилата	1	липсва	1	липсва	9	има	1	липсва	9	има
17.	Кочан - интензивност на антоц. оцветяване на свилата	1	липсва	1	липсва	3-5	слабо-средно	1	липсва	3-5	слабо-средно
18.	Лист - антоц. оцветяване на влагалището	1	липсва	1	липсва	1	липсва	1	липсва	1	липсва
19.	Метлица - дълж. на гл. ос над най-долното разклонение	5	средна	5-7	средна-дълга	5	средна	5	средна	5	средна
20.	Метлица - дълж. на гл. ос над най-горното разклонение	5	средна	5	средна	5	средна	3-5	къса-средна	5	средна
21.	Метлица - дължина на страничните разклонения	3-5	къси-средни	5	средни	3-5	къси-средни	3-5	къси-средни	3-5	къси-средни
22.	Обща височина на растението	7	дълго	5	средно	5	средно	3	късо	5	средно
23.	Съотношение м/у височината на раст. и на залагане на 1 кочан	5	средно	5	средно	3	малко	3	малко	3	малко
24.	Лист - ширина на петурата	5	среден	5	среден	5	среден	5	среден	5	среден
25.	Кочан - дължина на дръжката	1	много къса	1	много къса	1	много къса	1	много къса	1	много къса
26.	Кочан - дължина без обвивките	5	среден	5	среден	5	среден	5	среден	5	среден
27.	Кочан - диаметър в средата	5	среден	5	среден	5	среден	5	среден	5	среден
28.	Кочан - форма	3	цилиндричен	2	конично-цилинд.	2	конично-цилинд.	2	конично-цилинд.	2	конично-цилинд.
29.	Кочан - брой на редовете зърна	5	среден	5	среден	3-5	малък-среден	3-5	малък-среден	3-5	малък-среден
30.	Кочан - тип на зърното (в средната третина на коч.ана)	5	зъбовиден	4	подобен на конски зъб	4	подобен на конски зъб	3-4	ср. тв.-под. на к. зъб	5	подобен на конски зъб
31.	Кочан - цвят на върха на зърното	3	жълт	1	бял	4	жълто-оранжев	3	жълт	4	жълто-оранжев
32.	Кочан - цвят на гръбната страна на зърното	4	жълто-оранжев	1	бял	5	оранжев	4	жълто-оранжев	5	оранжев
33.	Кочан - антоц. оцветяване на плевите на вретеното	9	има	1	липсва	9	има	9	има	9	има
34.	Кочан - интензивност на оцветяване на плевите на вретеното	5	средно	1	много слабо	5	средно	3	слабо	5	средно

Таблица 2. Оценка на мутантни линии ФМ 4662, К 4640Б и изходната им линия В 73 по маркерни компоненти на зеина
Table 2. Zein band composition of the mutant maize inbreds ФМ 4662, К 4640Б and their progenitor line В 73

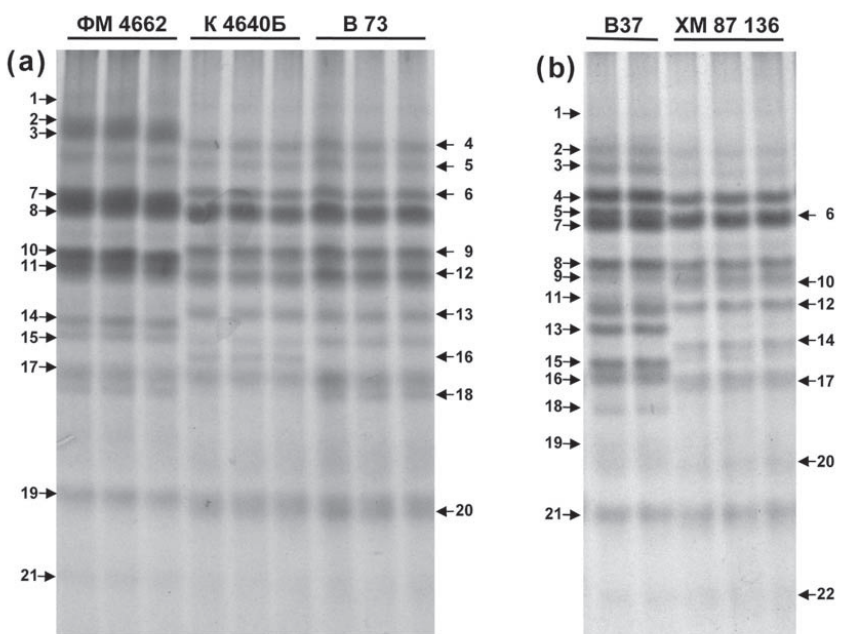
№ зеинова ивица	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ФМ 4662	1	2	2	-	1	-	3	3	-	3	3	-	-	1	1	-	1	1	1	-	1
К 4640Б	1	-	-	1	1	2	-	3	2	-	-	2	1	-	1	1	1	-	1	1	1
В 73	1	-	-	1	1	2	-	3	2	-	-	2	1	-	1	-	2	1	1	1	1

Забележка. Интензитета на зеиновите ивици е означен по скала от 1 до 3. Липсата на ивица със съответната подвижност е означена с (-).
Note. The intensity of the zein bands is scored by scale from 1 to 3. The lack of band with the respective mobility is marked as (-).

Таблица 3. Оценка на мутантни линия XM 87 136 и изходната ѝ линия В 37 по маркерни компоненти на зеина
Table 3. Zein band composition of the mutant maize inbred XM 87 136 and its progenitor line В 37

№ зеинова ивица	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
XM 87 136	1	1	1	3	-	3	-	2	-	1	-	2	1	1	1	1	1	-	-	1	2	1
В 37	1	2	2	3	3	-	3	3	1	-	1	2	2	-	2	2	-	1	1	1	2	1

Забележка. Интензитета на зеиновите ивици е означен по скала от 1 до 3. Липсата на ивица със съответната подвижност е означена с (-).
Note. The intensity of the zein bands is scored by scale from 1 to 3. The lack of band with the respective mobility is marked as (-).



Фиг. 1. Електрофореграми на спиртно разтворими резервни белтъци (зеини) при мутантни линии царевица и техните изходни линии. Белтъчните ивици са номерирани според подвижността им в ПААГ с поредни номера от бавно към бързо подвижни. Номерата са нанесени от двете страни на гела за по-лесна идентификация на ивиците. Панел (а): Стартове 1-3 ФМ 4662, 4-6 К 4640Б, 7-9 В 73; Панел (б): Стартове 1-2 В 37, 3-5 XM 87 136.

Fig. 1. Electrophoregrams of alcohol-soluble storage proteins (zeins) of mutant maize inbreds and their progenitor lines. Protein bands are consecutively numbered according to their mobility starting with the slowest one. The numbers are entered at the two sides of the gel for easier identification of the bands. Panel (a): lanes 1-3 ФМ 4662, 4-6 К 4640Б, 7-9 В 73; Panel (b): lanes 1-2 В 37, 3-5 XM 87 136.

тъците в гела са фиксирани и оцветявани в 0,25% Coomassie R-250, разтворен в 50% CH₃OH и 10% CH₃COOH. След обезцветяване на геловите в дестилирана вода същите са документирани и изсушени между два пласта целофан.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от изследваните 34 признаци са представени в табл. 1, подредени в зависимост от времето на тяхната експресия. За всяка от линиите са отразени и балните оценки на признаците от 1 до 9, заедно с текстово описание в съседната колона. Проведеното изследване ясно показва, че мутантните линии се различават, както помежду си, така и в сравнение с изходните форми по редица фенотипни признаци. При сравнителен анализ на мутантните линии ФМ 4662 и К 4640Б и тяхната изходна форма В 73 е установено различие, съответно по 17 и 20 признака. Особен интерес представляват признаци № 2, 4, 6, 7, 10, 16, 22, 28 и 30-34, които стабилно се проявяват през трите години на изследването, докато признаци с номера 5, 8, 18, 20, 24, 25, 26 и 27 не показват вариране между разглежданите линии. XM 87 136 и В 37 се различават по 15 от изследваните признаци, като признаци № 1, 2, 4, 7, 13, 16, 22, 31, 32 и 34 показват стабилно проявление и са надеждни маркери за идентификация на двете линии.

Добра възможност за търсене на допълнителни маркери за идентификация и сравняване на мутантните линии с изходните им форми дава електрофоретичният профил на генетически полиморфните проламинови белтъци на царевицата – зеини. На фиг. 1 са представени електрофореграми на зеини на изследваните линии. Всяка от тях показва електрофоретичен профил, включващ 14 – 18 броя

белтъчни ивици с различен интензитет и подвижност, което потвърждава резултати, съобщени в предходни изследвания на линии, създадени чрез класически методи на селекция (Конарев, 1983; Zayakina, Sozinov, 2000; Сидерова, 2004), както и при мутантни и трансформирани линии царевица (Christova et al, 1993; Илчовска, 2000). В сравнение с тяхната изходна форма В 73, мутантните линии ФМ 4662 и К 4640Б показват еднакъв брой (14), но различен набор от ивици. По-съществени различия от изходната линия В 73 в зеиновия спектър се наблюдават при линия ФМ 4662. Те се отнасят до 13 броя зеинови ивици с номера 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 20 и 21 (табл. 2). Шест от тях (№ 4, 6, 9, 12, 13 и 20) липсват в мутантната линия, а останалите – в изходната ѝ форма. За разлика от ФМ 4662, зеиновият спектър на мутантната линия К 4640Б е по-близък до този на изходната ѝ линия В 73. Разликите се отнасят до липса на зеинова ивица № 16 в В 73 и ивица № 18 в К 4640Б. Зеиновите ивици на мутантните линии се различават и по интензитет, означен в табл. 2 по скала от 1 до 3. Разлика в интензитета се наблюдава единствено при ивица № 17, като той е по-висок при линия В 73. Мутантната линия ХМ 87 136 и нейната изходна форма В 37 показват електрофоретични спектри със сходен брой ивици, съответно 16 и 18, но твърде различни по отношение на подвижността и интензитета на зеиновите компоненти (табл. 3). Разликите в електрофоретичните спектри на двете линии се отнасят до 16 зеинови ивици с номера 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19. От тях в спектъра на линия ХМ 87 136 липсват 6 ивици (№ 5, 7, 9, 11, 18 и 19), а в спектъра на В 37 – 4 броя (№ 6, 10, 14 и 17). Останалите шест ивици с номера 2, 3, 8, 13, 15 и 16 се различават по своя интензитет, който е по-висок при изходната линия В 37.

Наблюдаваните различия в експресията на зеиновите компоненти при мутантните и изходните линии вероятно се дължат на мутации в зеиновите гени, водещи до нарушаване на рамката на четене, дестабилизиране на РНК или експресия на протеин с различна молекулна маса. Чрез секвениране на експресиращите се алфа-зеинови кДНК, Feng et al. (2009) установяват, че голям брой от гените са мълчащи в резултат на натрупани мутации и предполагат, че експресиращите се неалелни зеинови гени в различните инбредни линии произхождат от псевдогени. Същите автори лансират и хипотезата, че има селективен натиск върху броя на експресираните зеинови гени, което обяснява и относително постоянния брой зеинови ивици, наблюдавани при различните мутантни и изходни линии в настоящето изследване.

Установените различия в спектрите на зеина при изследваните линии представляват уникални белтъчни маркери, специфични за всяка една от тях.

ИЗВОДИ

Експерименталният мутагенезис е ефективно средство за индуциране на генетично разнообразие в инбредни линии царевица.

По-голям брой фенотипни различия се наблюдават между мутантните линии ФМ 4662 и К 4640Б и тяхната изходна форма В 73.

Установени са белтъчни маркери за разграничаване на мутантните от изходните линии с висок потенциал за приложение в селекцията и семепроизводството на царевицата.

ЛИТЕРАТУРАТА

Генов, М. 1988. Генетични проучвания върху диплоидни и тетраплоидни царевици във връзка с хетерозиса и мутационната изменчивост. Дисертация. Институт по царевицата, Кнежа.

Илчовска, М. 2000. Проучване на възможностите за безвекторен пренос на гени при царевицата. Биохимична и селекционно-генетична оценка на новополучените материали. Дисертация. Институт по царевицата, Кнежа.

Христов, К., П. Христова. 1995. Мутационна селекция при царевицата-методи и постижения. *Растениевъдни науки*, vol. XXXII, № 1-2, 40-43

Конарев, В. 1983. Белки растений как генетические маркеры. *Колос*, Москва.

Попереля, Ф. А., Ю. А., Асыќа. 1988. Методические указания по электрофорезу зеина кукурузы для определения процента гибридности F_1 . Москва.

Сидерова, В. В., А. В. Конарев, Г. В. Матвеева, Г. И. Тимофеева. 2004. Использование электрофоретического спектра зеина для прогнозирования гетерозиса у кукурузы. *Аграрная Россия*, № 6, 34-41

Christov, N., Todorovska, E., Fasoula, D., Ioannides, I., Atanassov, A. and K. Hristov. 2004. Molecular characterization of chemical mutagenesis induced diversity in elite maize germplasm. *Acta Biologica Yugoslavica Genetica*, 36, No. 1, 47-60

Christova, P., Christov, I., Christov, N., Christov, K. 1993. Chemical mutagenesis affects some quantitative traits and the zein composition of maize inbred lines. In: A. Bianci, E. Lupotto and M. Motto (eds). Proceedings of the XVI Eucarpia Maize and Sorghum Conference, Bergamo, Italy, 166-173

Feng, L., Zhu, J., Wang, G., Tang, Y., Chen, H., Jin, W., Wang, F., Mei, B., Xu, Z. Song, R. 2009. Expressional profiling study revealed unique expressional patterns and dramatic expressional divergence of maize alpha-zein super gene family. *Plant Molecular Biology*, 69, 649-659

Kostova, A., Todorovska, E., Christov, N., Hristov, K., A. Atanassov. 2006. Assessment of genetic variability induced by chemical mutagenesis in elite maize germplasm via SSR markers. *J. Crop Improvement*, 16 (1/2), 37-48

Tomleкова, N. 2010. Induced Mutagenesis for Crop Improvement in Bulgaria. *Plant Mutation Reports*, vol. 2, No. 2, 3-27

UPOV. 2009. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability-maize (*Zea mays* L.). UPOV TG/2/7, 63.

Zayakina, G. V., A. A. Sozinov. 2000. Inheritance of zeins: The catalogue of zein alleles of three multigenic loci and its potential for maize breeding. *Plant Breeding*, 119, 51-57

Благодарности.

Настоящето изследване е финансирано от НФНИ – МОМН по Договор СС-1606/2006 г.