

RTG/2/1

УТВЕРЖДАЮ:

Зам. председателя Государственной комиссии Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений

В.В. Шмаль

5 октября 1998 г. № 12-06/14

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ НА ОТЛИЧИМОСТЬ, ОДНОРОДНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ

КУКУРУЗА (*Zea mays L.*)*

Общие рекомендации

1. Одновременно следует руководствоваться документом RTG/01/2 "Общие положения методики по испытанию селекционных достижений на отличимость, однородность и стабильность".

2. Полевые испытания проводят при условиях, обеспечивающих нормальное развитие растений, как правило, в двух местах, в течение не менее двух лет.

3. Для испытания заявитель должен ежегодно высылать:

- а) инбредная линия - 1500 жизнеспособных зерен;
- б) гибрид или сорт - 1 кг семян.

Семена для испытаний должны быть получены от урожая предыдущего года, если Госкомиссия не сделает специального исключения. Заявитель, высылающий семена из другой страны, должен полностью соблюдать все таможенные правила. Семена должны соответствовать по посевным качествам семенам I класса ГОСТ.

Семена не должны быть обработаны ядохимикатами, если на то нет разрешения или требования Госкомиссии. Если семена были обработаны, то необходимо дать подробное описание обработки.

4. Сорты опыта должны быть разбиты на группы для облегчения оценки на отличимость. Для группировки используют такие показатели, которые, исходя из практического опыта, не варьируют или варьируют незначительно в пределах сорта и их варьирование в пределах коллекции распределено равномерно.

Рекомендуется использовать для группировки следующие признаки:

- 1) метелка: время цветения (признак 7);
- 2) початок: антоциановая окраска шелка (признак 16);
- 3) растение: высота (признак 22.1/22.2);
- 4) початок: тип зерна (признак 30);
- 5) початок: антоциановая окраска стержня (признак 33).

* Использован документ УПОВ TG/2/6 "GUIDELINES FOR THE CONDUCT OF TESTS FOR DISTINCTNESS, HOMOGENEITY AND STABILITY". Оригинал на английском языке от 04.11.94.

5. Как минимум каждое испытание должно включать в общем 40 растений для инбредных линий и простых гибридов или 80 растений для других гибридов и сортов в двух повторениях.

В опыте по оценке отличимости и однородности размер делянки должен быть таким, чтобы при отборе растений или их частей для измерений не наносилось ущерба наблюдениям, которые продолжаются до конца вегетационного периода.

Размещение сортов систематическое, без смещения во втором повторении. Оцениваемый и похожий на него сорта размещают на смежных делянках. Аналогично размещают делянки, засеянные семенами разных лет поставки. В опыте размещают и делянки эталонных сортов.

Правильность формулы гибрида оценивают с помощью электрофореза ферментов. Испытания проводят по четырем колеоптиле каждой инбредной линии. В случае сомнений дополнительно анализируют 16 колеоптиле. У простых гибридов анализируют 2 колеоптиле, а для трехлинейных гибридов - 6 колеоптиле. В случае сомнений анализируют дополнительные колеоптиле.

Если электрофорез ферментов используется для оценки отличимости, анализируют не менее 20 колеоптиле.

6. Для определения отличимости и однородности обследуют минимум 40 растений или частей (стебель, лист и т.п.) сорока растений (исключая растения, полученные от перекрестного опыления в инбредных линиях, и растения, явно полученные от самоопыления инбредных линий при получении простого гибрида). Нетипичные растения отмечают лентой, этикеткой и т.п.

Количество отклоняющихся форм для инбредных линий и простых гибридов не должно превышать 3 на 40 растений. При этом надо учитывать перекрестноопыленные растения для инбредных линий и самоопыленные растения для простых гибридов (явно отличающиеся по высоте растений, размеру початка или группе спелости, а также результаты, полученные при электрофорезе ферментов).

Для оценки однородности гибридов других типов и сортов используют относительные пределы изменчивости методом сравнения с хорошо изученными гибридами и сортами.

Если для оценки отличимости применяют электрофорез ферментов (Приложение 2), то используют тот же самый критерий однородности, что и для других признаков. Все инбредные линии признаются несамоопыленными, если два или более локуса гетерозиготны, так как в инбредной линии только один аллель в локусе (например, АХ). Все случаи, когда один локус гетерозиготен или когда имеются два инородных аллеля, должны считаться отклоняющимися типами.

7. Оценка отличимости гибридов, предписываемая системой на основе родительских линий и формулы, может быть установлена согласно следующим рекомендациям:

- 1) описание родительских линий согласно методике;
- 2) проверка оригинальности этих родительских линий сравнением с представительной коллекцией;
- 3) проверка оригинальности формулы гибрида в сравнении с формулой общеизвестных гибридов;
- 4) проверка отличимости гибридов с похожей формулой.

8. Для сложных гибридов некоторые признаки могут подразделяться на несколько значений, которые одновременно присущи данному гибриду. Некоторые признаки, по опыту уже известные своей склонностью к подобному проявлению у сложных гибридов, снабжены пометой "S", что, однако, не исключает возникновения других подобных признаков.

9. Для оценки степени выраженности признаков отличимости, однородности и стабильности должны быть использованы признаки, приведенные в "Таблице признаков". Отметка (*) указывает на то, что данный признак следует применять каждый вегетационный период для оценки всех сортов и всегда включать в описание сорта, за исключением случаев, когда состояние выраженности предыдущего признака или региональных условий окружающей среды делает это невозможным. Отметка (+) указывает на то, что описание признака в методике сопровождается объяснениями или иллюстрациями.

Оптимальное время проведения учета признака указано во второй колонке кодом стадий развития зерновых культур. Шкала стадий развития зерновых культур приведена в приложении 1.

S - смотри пояснения на возможное проявление признака в пункте 8.

10. Значениям выраженности признака приданы индексы (1 - 9) для электронной обработки результатов.

По некоторым значениям выраженности признака указаны эталонные сорта.

Таблица признаков

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс
1. Первый лист: антоциановая окраска влагалища	12 (S)	отсутствует или очень слабая		1
		слабая	F 113	3
		средняя	F 2	5
		сильная	F 244	7
		очень сильная		9
2. Первый лист: форма верхушки (+)	14	острая	W 117	1
		от острой до округлой		2
		округлая	F 2	3
		от округлой до тупой		4
		тупая		5
3. Лист: угол между пластинкой и стеблем (на листе непосредственно ниже верхнего початка) (+)	61	очень маленький		1
		маленький		3
		средний	W 117	5
		большой	F 252	7
		очень большой		9
4. Лист: положение пластинки (как для 3) (+)	61	прямая	F 252	1
		слегка изогнутая	F 1444	3
		изогнутая		5
		сильноизогнутая	F 186	7
		очень сильноизогнутая	CM 7	9
5. Стебель: искривленность	65	отсутствует или очень слабая	Eva, Ivana	1
		слабая	Sabrina	2
		сильная	Dea, F 252	3

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс
6. Стебель: антоциановая окраска корней у стебля	65-75 (S)	отсутствует или очень слабая	W 182E	1
		слабая	F 7	3
		средняя	F 2	5
		сильная	A 632	7
		очень сильная		9
7. Метелка: время цветения (на средней трети главной оси 50% растений) (*)	65	очень раннее		1
		от очень раннего до раннего	KW 1069	2
		раннее	F 7	3
		от раннего до среднего	F 259	4
		среднее	W 117	5
		от среднего до позднего	A 632	6
		позднее	M 017	7
		от позднего до очень позднего	B 73	8
		очень позднее		9
8. Метелка: антоциановая окраска основания колосковой чешуи (в средней трети главной оси) (+)	65 (S)	отсутствует или очень слабая	W 117	1
		слабая	F 2	3
		средняя	F 107	5
		сильная	EP 1	7
		очень сильная		9
9. Метелка: антоциановая окраска чешуй, исключая основание (как для 8)	65 (S)	отсутствует или очень слабая	F 16	1
		слабая	F 2	3
		средняя	EP 1	5
		сильная	W 79A	7
		очень сильная		9
10. Метелка: антоциановая окраска пыльников (как для 8; на свежих пыльниках)	61 (S)	отсутствует или очень слабая	F 244	1
		слабая	F 2	3
		средняя	W 182E	5
		сильная	F 195	7
		очень сильная		9
11. Метелка: плотность колосков (как для 8)	65	редкие	F 16	3
		средние	W 401	5
		плотные	EP 1	7
12. Метелка: угол между главной осью и боковыми веточками (в нижней трети метелки) (* (+)	65	очень маленький		1
		маленький	F 257	3
		средний	EP 1	5
		большой	W 117	7
		очень большой		9
13. Метелка: положение боковых веточек (как для 12) (* (+)	65 (S)	прямые	F 257	1
		слегка изогнутые	A 619	3
		изогнутые	CM 7	5
		сильноизогнутые	W 117	7
		очень сильноизогнутые		9
14. Метелка: число первичных боковых веточек (*)	65	отсутствуют или очень мало	F 7	1
		мало	F 252	3
		среднее количество	F 244	5
		много		7
		очень много		9

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс
15. Початок: время появления шелка (50% растений)	65	очень раннее		1
		от очень раннего до раннего		2
		раннее	F 7	3
		от раннего до среднего	F 259	4
		среднее	W 117	5
		от среднего до позднего	A 632	6
		позднее	M 017	7
		от позднего до очень позднего	B 73	8
		очень позднее		9
16. Початок: антоциановая окраска шелка (*)	65 (S)	отсутствует	F 7	1
		имеется	F 2	9
17. Початок: интенсивность антоциановой окраски шелка (*)	65 (S)	очень слабая	CM 105	1
		слабая	F 186	3
		средняя	W 401	5
		сильная		7
		очень сильная		9
18. Лист: антоциановая окраска влагалища (в средней трети растения)	71 (S)	отсутствует или очень слабая	F 7	1
		слабая	F 186	3
		средняя	F 195	5
		сильная	EP 1	7
		очень сильная		9
19. Метелка: длина главной оси выше нижней боковой ветви	71	очень короткая		1
		короткая	EP 1	3
		средняя	F 244	5
		длинная	F 16	7
		очень длинная		9
20. Метелка: длина главной оси выше верхней боковой ветви (*)	71	очень короткая		1
		короткая	EP 1	3
		средняя	F 259	5
		длинная	F 16	7
		очень длинная		9
21. Метелка: длина боковых ветвей	71	очень короткие	KW 1332	1
		короткие	F 2	3
		средние	Rantzo	5
		длинные	Diamant	7
		очень длинные		9
22.1 Только инбредные линии: Растение: высота (включая метелку) (*)	75	очень низкое	F 7	1
		низкое	W 117	3
		среднее	W 182E	5
		высокое	M 017	7
		очень высокое		9
22.2 Только сорта и гибриды: Растение: высота (включая метелку) (*)	75	очень низкое	Nano-Dos	1
		низкое	DK 232	3
		среднее	Magister	5
		высокое	Cecilia	7
		очень высокое	Alimare	9
23. Растение: отношение высоты прикрепления верхнего початка к высоте растения	75	очень малое		1
		малое	F 259	3
		среднее	F 522	5

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс
		большое	A 632	7
		очень большое		9
24. Лист: ширина пластинки (лист верхнего початка)	75	очень узкий		1
		узкий	F 16	3
		средний	A 632	5
		широкий	W 182E	7
		очень широкий		9
25. Початок: длина ножки	85	очень короткая		1
		короткая	F 7	3
		средняя	W 182E	5
		длинная	F 492	7
		очень длинная		9
26. Початок: длина (без обертки) (*)	92	очень короткий		1
		короткий	F 2	3
		средний	A 654	5
		длинный	CM 7	7
		очень длинный		9
27. Початок: диаметр (в середине)	92	очень тонкий		1
		тонкий	F 7	3
		средний	W 401	5
		толстый	B 73	7
		очень толстый		9
28. Початок: форма	92	конический	F 16	1
		слабоконический	F 7	2
		цилиндрический	F 66	3
29. Початок: количество рядов зерен	92	очень мало		1
		мало	F 2	3
		средне	EP 1	5
		много	B 73	7
		очень много		9
30. Початок: тип зерна (в центральной трети початка) (*)	92 (S)	кремнистый	F 2	1
		промежуточный, ближе к кремнистому	A 252	2
		промежуточный	CO 125	3
		промежуточный, ближе к зубовидному	F 259	4
		зубовидный	W 401	5
		сахарный	Jubilee	6
		поп-корн	Iowa Pop	7
31. Початок: окраска верхней части зерна (*)	92 (S)	белая	A 188	1
		желтовато-белая		2
		желтая	W 401	3
		желто-оранжевая	F 2	4
		оранжевая	F 257	5
		красно-оранжевая		6
		красная		7
		темно-красная		8
		голубовато-черная		9
32. Початок: окраска нижней части	92	белая	F 481	1

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс
зерна	(S)	желтовато-белая	A 188	2
		желтая	A 654	3
		желто-оранжевая	F 2	4
		оранжевая	F 7	5
		красно-оранжевая		6
		красная		7
		темно-красная		8
		голубовато-черная		9
33. Початок: антоциановая окраска (*), стержня	93	отсутствует	F 2	1
	(S)	имеется	W 117	9
34. Початок: интенсивность антоциановой окраски стержня початка	93 (S)	очень слабая		1
		слабая		3
		средняя	Dea, Prisma	5
		сильная	Pianosa	7
		очень сильная	Alios	9

Объяснения и методы проведения учетов

К 2. Первый лист: форма верхушки



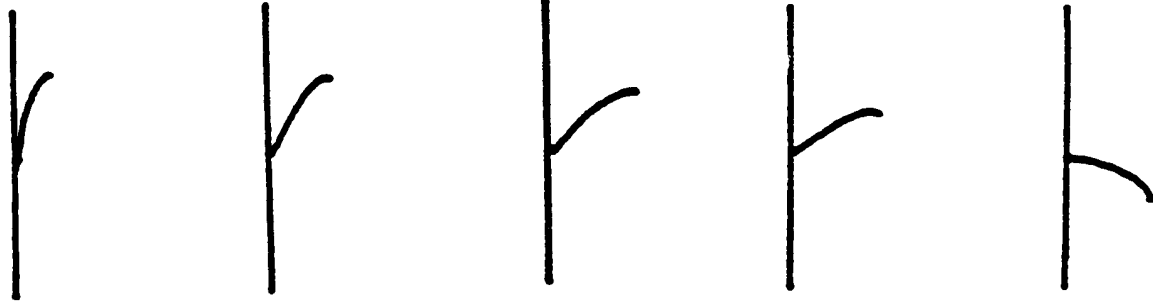
острая

от острой до
округлой

округлая

от округлой до
тупой

тупая

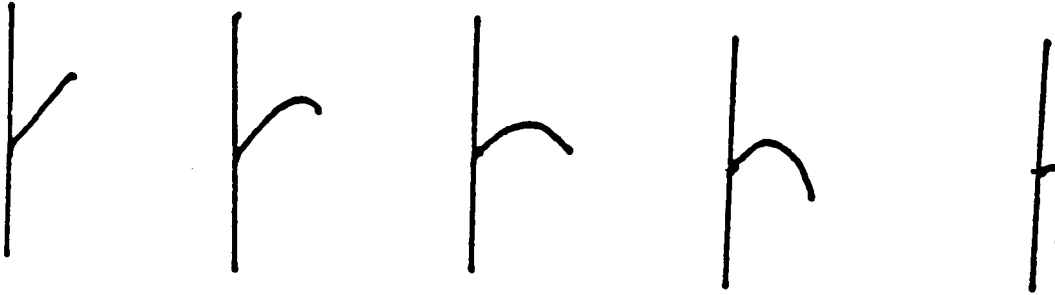
К 3 + 12. Лист и метелка: угол

очень маленький <math>< 5^\circ</math> маленький 25°

средний 50°

большой 75°

очень большой $> 90^\circ$

К 4 + 13. Лист и метелка: положение пластинки и боковых веточек

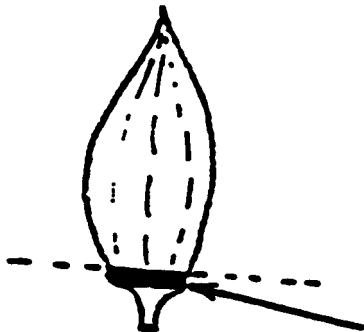
прямые

слегка
изогнутые

изогнутые

сильно-
изогнутые

очень сильно-
изогнутые

К 8. Метелка: антоциановая окраска основания колосковой чешуи (в средней трети главной оси)

КОД СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР*

Код	Общее описание
00	<u>Появление всходов</u> Сухие семена
12	<u>Всходы</u> 2 листа развернуты
14	4 листа развернуты
51(о , о)	<u>Кущение</u> <u>Рост стебля</u> <u>Выход в трубку</u> <u>Появление соцветия</u> Соцветия полностью видны
61(о , о)	<u>Цветение</u> Начало цветения
65(о , о)	Середина цветения
71	<u>Молочная спелость</u> Водянистое состояние
75	Середина молочной спелости
85	<u>Восковая спелость</u> Мягкая восковая спелость
92	<u>Полная спелость</u> Зерновка твердая (не режется ногтем)
93	Зерновка становится свободной в дневное время

Литература

* (Воспроизведено с EUCARPIA Bulletin No. 7, 1974, стр. 49-52, с разрешения авторов).

Bourgoin-Greneche, M., and Lallemand, J., 1993: Electroforesis and its application to the description of varieties. A presentation of techniques used by GEVES, Ed. GEVES, Guyancourt

Bourgoin-Greneche, M., and Giraud, G., 1994: Technical reference manual for the isoenzymatic analysis of maize. Presentation of the method for scoring the gels and interpretation of the zymogrammes. Ed. GEVES, Guyancourt

Cardy, B.J., and Kanneberg, L.W., 1982: Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: applications for cultivar identification, *Crop. Sci.*, 22, 1016-1020

Coe, E., Hoisington, D., and Chao, S., 1990: Gene list and working maps. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 64, 134 - 163

Goodman, M.M., Stuber, C.W., 1983(c): In isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part B, 472 pp., Ed. par Tanksley, S.D., and Orton, T.J., Elsevier, Amsterdam

Newton, K.J., and Schwarz, D., 1980: Genetic basis of the major malate dehydrogenase isozyme in maize. *Genetics*, 95, 425 - 442

Physiologie du maïs, Communications au colloque physiologie du maïs organisé par l'INRA, le CNRS et l'AGPM, Royan 15 - 17 mars 1983, 574 pages

Smith, J.S.C., and Weissinger, H., 1984: Rapid monitoring of purity in seed lots of hybrid maize: modifications of current technologies. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 58, 103 - 105

Stuber, C.W., Wendel, J.F., Goodman, M.M., and Smith, J.S.C., 1988: Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.) North Carolina Agricultural Research service - North Carolina State University, Raleigh

Wendel, J.F., Goodman, M.M., and Stuber, C.W., 1986: Additional mapping of isozyme loci: localization of Acp 4, Dia 2, Adk 1, Tpi 3, and Sad 1. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 60, 109 - 110

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ К МЕТОДИКЕ

Приложение содержит признаки, оцениваемые при использовании электрофореза. Эти признаки должны использоваться только в дополнение к другим отличиям по морфологическим или физиологическим признакам. UPOV обращает внимание, что эти характеристики считаются полезными, но они не могут сами по себе быть достаточными для установления отличимости. Они не должны использоваться в повседневной практике, а лишь при запросе или с согласия заявителя сорта.

Для анализа ферментов рекомендуется крахмальный гель. Полиморфизм ферментов (например, 16 локусов фермента) может быть выявлен. Для каждого фермента (локуса) известен генетический контроль. Описание метода и генетической интерпретации зимограмм сделано на основе технического бюллетеня Stuber, wendel, Goodman and Smith, 1988 и технического руководства Greneche and Giraud, 1994. Аллели описаны числом полос согласно определению данному Cardy, Stubar, Goodman, 1980 (см. список литературы).

Таблица

Признак	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс
35. Аллель, выраженная в локусе Mdh 1	генотип 1/1	F 252	1
	генотип 1/6 во взаимодействии с аллелем 6 Mdh 2	Tau	
	генотип 6/6	A 239	2
	генотип 1/6, но не во взаимодействии с аллелем 6 Mdh 2	Marshall	3
36. Аллель, выраженная в локусе Mdh 2	генотип 3/3	F 252	1
	генотип 3/4.5	Robin	2
	генотип 4.5/4.5	W 401	
	генотип 6/6	A 239	3
	генотип 3/6	Azur	4
генотип 4.5/6		5	
37. Аллель, выраженная в локусе Mdh 3	генотип 16/16	F 252	1
	генотип 18/18	Co 158	2
	генотип 16/18	Figaro	3
38. Аллель, выраженная в локусе Mmm	генотип M/M	F 252	1
	генотип M/m		2
	генотип m/m		
39. Аллель, выраженная в локусе Mdh 4 + Mdh 5	генотип 12/12 + 12/12	F 252	1
	генотип 12/12 + 15/15	F 2	2
	генотип 12/12 + 12/15	Robin	
40. Аллель, выраженная в локусе Idh 1 + Idh 2	генотип 4/4 + 4/4	A 239	1
	генотип 4/6 + 4/4	CM 7	2
	генотип 4/4 + 6/6		
	генотип 6/6 + 4/4	F 1110	3
	генотип 6/6 + 6/6	Co 158	4
	генотип 4/6 + 6/6	Bonny	5
	генотип 4/4 + 4/6	Axon	
	генотип 4/6 + 4/6	Loft	
Признак	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс

41.	Аллель, выраженная в ло- кусе Pgd 1 + Pgd 2	генотип 2/2 + 5/5	W 401	1
		генотип 2/2 + 2.8/2.8		2
		генотип 3.8/3.8+2.8/2.8	A 632	3
		генотип 3.8/3.8 + 5/5	F 252	4
		генотип 3.8/3.8 + 2.8/5	Tekila	
		генотип n/n + 5/5	H 108	5
42. 1	Только инбредные линии: Аллель, выраженная в ло- кусе Pgm 1 + Pgm 2	генотип 2/3.8 + 5/5	Bekefix	6
		генотип 2/3.8 + 2.8/5	Furio	
		генотип 9/9 + 1/1	F 2	1
		генотип 9/9 + 3/3	F 16	2
		генотип 16/16 + 4/4		
		генотип 9/9 + 4/4	A 632	3
42. 2	Только гибриды и сорта: Аллель, выраженная в ло- кусе Pgm 1 + Pgm 2	генотип 9/9 + 8/8	Mo 17	4
		генотип 16/16 + 1/1		5
		генотип 16/16 + 3/3		
		генотип 16/16 + 8/8		6
		генотип 9/9 + 1/1		1
		генотип 9/9 + 1/3	Robin	
43.	Аллель, выраженная в ло- кусе Pgi 1	генотип 9/9 + 3/3		
		генотип 9/9 + 3/4	Figaro	
		генотип 9/9 + 4/4		
		генотип 9/9 + 1/4	Axon	
		генотип 16/16 + 4/4		
		генотип 9/9 + 8/8		2
		генотип 9/9 + 3/8		
		генотип 9/9 + 4/8	Occitan	
		генотип 9/9 + 1/8		3
		генотип 16/16 + 1/1		4
		генотип 16/16 + 1/3		
		генотип 16/16 + 3/3		
генотип 16/16 + 8/8		5		
44. 1	Только инбредные линии: Аллель, выраженная в ло- кусе Asp 1	генотип 4/4	A 239	1
		генотип 5/5	A 632	2
		генотип 4/5	Artist	3
44. 2	Только гибриды и сорта: Аллель, выраженная в ло- кусе Asp 1	генотип 2/2	F 2	1
		генотип 3/3	A 632	2
		генотип 4/4	A 239	1
45.	Аллель, выраженная в ло- кусе Dia 1	генотип 6/6	F 1444	2
		генотип 2/3	Azur	1
		генотип 2/2		
		генотип 3/3		
		генотип 4/6	Contessa	2
		генотип 4/4		
46.	Аллель, выраженная в ло- кусе Adh 1	генотип 6/6		
		генотип 2/4	Occitan	3
		генотип 2/6		4
		генотип 3/4	Marshall	5
		генотип 3/6		6
		генотип 8/8	F 2	1
генотип 12/12	Co 158	2		
генотип 8/12	Bastion	3		
Признак	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс	
46.	Аллель, выраженная в ло- кусе Adh 1	генотип 4/4	F 1444	1
		генотип 6/6	F 2	2
		генотип 4/6	Bristol	3

Описание метода SGE (электрофорез в крахмальном геле) для анализа изоэнзимов в *Zea mays* L.

1. Число колеоптиле для испытаний:

- для подтверждения формулы: 20 колеоптиле для инбредных линий;
 - 2 - для простых гибридов;
 - 6 - для трехлинейных гибридов;
- для оценки отличимости, однородности и стабильности: не менее 20 колеоптиле для инбредных линий, гибридов и сортов.

2. Приборы и оборудование

Используется любая подходящая система горизонтального электрофореза, предусматривающая хранение геля при температуре 4 °С, толщиной 10 мм. Должно поддерживаться постоянное напряжение на вводе.

3. Химикаты

Все химикаты должны быть уровня "аналитическая чистота" или лучше.

3.1 Химикаты для экстракции ферментов

L-аскорбиновая кислота
 Натриевая соль L-аскорбиновой кислоты
 Сахароза

3.2 Химикаты для электрофореза

Бромфенол синий
 Моногидрат лимонной кислоты
 L-гистидин
 Гидролизованный крахмал для электрофореза (Sigma s-4501 или равноценный)

3.3 Химикаты для окрашивания ферментов

Ледяная уксусная кислота
 Натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола
 Этанол
 EDTA-Na₂ (Na₂ соль этилендиаминтетраальдегидной кислоты)
 Fast Garnet GBC соль
 соль Na₂ D-фруктоза 6-фосфат
 Глюкоза-1-фосфатдегидрогеназа (Serva 22820 или 22822 или Sigma G5885)
 Соляная кислота (HCl)
 Соль Na₃ DL-изолимонной кислоты
 Гексагидрат хлорида магния
 DL-оксиянтарная кислота
 Диметилтиазолдифенилтетразоль (МТТ)
 β-никотинамидадениндинуклеотид (NAD)
 β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный (NADH)
 β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP)
 Nitro-blue tetrazol (NBT)
 NaOH
 Na₃ соль 1-нафтилфосфорной кислоты
 Дигидрат Na₃ соли 6-фосфоглюкозной кислоты
 Феназинметосульфат (PMS)
 Поливинилпирролидон 40 (PVP-40)

Тригидрат ацетата натрия
Tris -(hydroxymethyl) aminomethane (Tris)

4. Растворы

4.1 Раствор для экстракции

16,7 г сахарозы
8,3 г натриевой соли аскорбиновой кислоты
доливают до 100 мл деионизированной воды и доводят L-аскорбиновой кислотой до pH 7,4

4.2 Буферы для электрофореза

4.2.1 Буферы для SGE pH 6,5

4.2.1.1 Основной раствор: 0,364 М L-гистидин цитрата
50,44 Na₃Г L-гистидина
8,20 г моногидрата лимонной кислоты
довести до 1 л деионизированной водой

4.2.1.2 Буфер для миграции: 0,072 М L-гистидин цитрата pH 6,5
(основной раствор, разведенный 1 к 5)

400 мл основного раствора (4.2.1.1) доводят до 2 л деионизированной водой

4.2.1.3 Буфер для геля: 0,024 М L-гистидин цитрата
(основной раствор, разведенный 1 к 15)

80 мл основного раствора (4.2.1.1) доводят до 1200 мл деионизированной водой

4.2.2 Буферы для SGE pH 5,0

4.2.2.1 Буфер для миграции: 0,074 М L-гистидин цитрата pH 5
15,5 г L-гистидина
10,0 г моногидрата лимонной кислоты
доводят до 2 л деионизированной водой

4.2.2.2 Буфер для геля: 0,006 М L-гистидин цитрата
(буфер для миграции, разведенный 1 к 12)

100 мл буфера для миграции (4.2.2.1) доводят до 1200 мл деионизированной водой

4.2.2.3 Раствор бромфенола синего

50 г бромфенола синего растворяют в 100 мл деионизированной воды

4.3 Окрашивающие растворы

4.3.1 Основные растворы

4.3.1.1 1 М Tris-HCl pH 8,0

121,1 г Tris, доводят до 1 л деионизированной водой и подкисляют до pH 8,0 50% HCl

4.3.1.2 1 М Tris-HCl pH 9,1

121,1 г Tris, доводят до 1 л деионизированной водой и подкисляют до pH 9,1 50% HCl

4.3.1.3 1 М ацетата натрия pH 5,0

136,08 г тригидрата ацетата натрия доводят до 1 л деионизированной водой и подкисляют до pH 5,0 ледяной уксусной кислотой

4.3.1.4 Раствор МТТ

1,0 г МТТ доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.1.5 Раствор NBT

1,0 г NBT доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.1.6 Раствор PMS

200 мг PMS доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.1.7 Раствор MgCl₂

21,35 г MgCl₂ доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.1.8 Раствор оксиянтарной кислоты

5,0 г DL-оксиянтарной кислоты доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.2 Окрашивающие растворы (объем: 200 мл)

4.3.2.1 Окрашивающий раствор MDH + ADH

20 мл Tris-HCl pH 9,1 (4.3.1.2)

+ 180 мл деионизированной воды

+ 8 мл раствора оксиянтарной кислоты (4.3.1.8)

+ 10 мл этанола

+ 80 мг NAD

+ 4 мл раствора NBT (4.3.1.5)

+ 3 мл раствора PMS (4.3.1.6)

4.3.2.2 Окрашивающий раствор IDH

20 мл Tris-HCl pH 8,0 (4.3.1.5)

+ 180 мл деионизированной воды

+ 500 мг соли Na₃ DL-изолимонной кислоты

+ 80 мг раствора MgCl₂ (4.3.1.7)

+ 6 мг NADP

+ 4 мл раствора МТТ (4.3.1.4)

+ 3 мл раствора PMS (4.3.1.6)

4.3.2.3 Окрашивающий раствор PGI + PGD

10 мл Tris-HCl pH 8,0 (4.3.1.1)

+ 190 мл деионизированной воды

+ 200 мг соли Na₂ фруктозо-6-фосфата

+ 80 мг тригидрата соли Na₃ 6-фосфоглюконовой кислоты

+ 2 мл раствора MgCl₂ (4.3.1.7)

+ 20 мг NADP

+ 2 мл раствора МТТ (4.3.1.4)

+ 3 мл раствора PMS (4.3.1.6)

+ 50 единиц глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

4.3.2.4 Окрашивающий раствор PGM

20 мл Tris HCl pH 8,0 (4.3.1.1)

+ 180 мл деионизированной воды

+ 1 г глюкозо-1-фосфата

+ 200 мг соли Na₂ EDTA

+ 20 мг NADP

+ 3 мл раствора МТТ (4.3.1.4)

- + 2 мл раствора PMS (4.3.1.6)
- + 100 единиц глюкоза 6-фосфат дегидрогеназы
- 4.3.2.5 Окрашивающий раствор АСР
 - 4 мл раствора ацетата натрия pH 5,0 (4.3.1.3)
 - + 196 мл деионизированной воды
 - + 200 мг соли Fast Garnet GBC
 - + 492 мг дигидрата соли Na₃ 1-нафтилфосфата
 - + 2 мл раствора MgCl₂ (4.3.1.7)
- 4.3.2.6 Окрашивающий раствор DIA
 - 20 мл Tris-HCl pH 9,1 (4.3.1.2)
 - + 180 мл деионизированной воды
 - + 2 г PVD-40
 - + 20 мг NADH
 - + 16 мл раствора МТТ (4.3.1.4)
 - + 16 мг соль Na 2,6-дихлорфенолиндофенола

5. Проведение анализа

5.1 Экстракция фермента

Сеянцы кукурузы выращивают на влажной бумаге при температуре 25 °С в темноте. Через 6 дней берут индивидуальные колеоптиле и гомогенизируют при температуре 4 °С пестиком в микро-трубках, содержащих 0,060 экстракционного раствора (3.1). Экстракты можно хранить при температуре -30 °С.

5.2 Приготовление геля

Приготовление двух 12,5% крахмальных гелей (18x18x1 см): 128 г крахмала смешать с 1020 мл буфера для геля (4.2.1.3 или 4.2.2.2) в колбе Бюхнера при температуре 80 °С. Удалить газы из смеси в течение 40 секунд. Гель влить в формы для геля, как описано в инструкции к используемому оборудованию. Удалить образовавшиеся воздушные пузырьки. Гели оставить остывать при комнатной температуре не менее чем на два часа и обернуть полиэтиленом для ночного хранения.

5.3 Электрофорез

5.3.1 Танки для миграции наполнить соответствующим объемом буфера (4.2.1.2 или 4.2.2.1), предварительно охлажденным до температуры 4 °С. Экстракты ферментов (5.1) (30 экстрактов на гель 18x18x1 см) абсорбируют фитилями из хроматографической бумаги (ватман N 3) размером 15x2x1 мм. Фитили помещают в продольный разрез. В 1 см от каждого конца геля вставляют фитиль, смоченный раствором бромфенола синего (4.2.2.3). Электрофорез проводят при температуре 4 °С. Постоянное напряжение 200 V (максимальный ток 150 мА на 2 геля 18x18x1 см на 20 минут). Фитили затем удаляют и электрофорез продолжают при постоянном напряжении 280 V (максимальный ток 180 мА на два геля 18x18x1 см) до тех пор, пока маркер (бромфеноловый синий) не мигрирует на 14 см (4 часа).

5.4 Окрашивание ферментов

После электрофореза гели режут горизонтально на слои толщиной 1 мм. Верхний слой удаляют. Индивидуальные слои геля окрашивают выдерживанием в следующих растворах при температуре 37 °С, в темноте:

для MDH и ADH: раствор 4.3.2.1 для IDH: раствор 4.3.2.2
 для PGI и PGD: раствор 4.3.2.3 для PGM: раствор 4.3.2.4
 для ACP: раствор 4.3.2.5 для DIA: раствор 4.3.2.6

ACP мигрирует в первые 4 см геля; PGM идет дальше; поэтому можно окрасить эти два фермента на самом геле после разрезания.

Время окрашивания варьирует между 30 и 120 минутами. После окрашивания слои геля промывают в дистиллированной воде перед хранением. Следующая процедура может использоваться для долговременного хранения: сушка геля между двумя слоями целлофана или хранение в запечатанных полиэтиленовых пакетах.

6. Идентификация аллелей, кодирующих ферменты

6.1 Идентификация аллелей, кодирующих MDH

6.1.1 Генетическая интерпретация зимограмм

Фермент	Четвертичная структура	Хромосома	Локус	Аллели	
Оксиантарная дегидрогеназа (MDH)	Димерная	8	Mdh1	1; 6	Интергенные взаимодействия
		6L	Mdh2	3+3, 5*; 4, 5, 6	
		3L	Mdh3	16; 18	
		1L	Mmm		
		1L	Mdh4	12	----
		5S	Mdh5	12; 15	

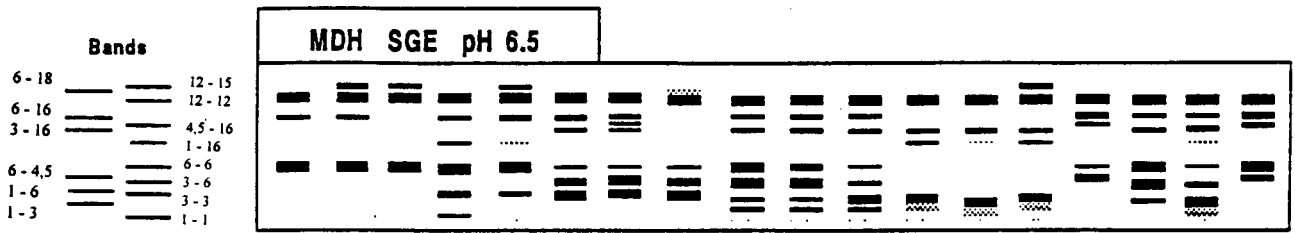
* Ферменты, закодированные аллелями 3 и 3,5, имеют очень близкую электрофоретическую подвижность: таким образом, они не дают отдельных отметок.

Имеют место взаимодействия между продуктами генов (полипептидными субединицами) с одной стороны, закодированными Mdh 1, Mdh 2, Mdh 3, и, с другой стороны, закодированными Mdh 4 и Mdh 5.

Генотип						Пример инбредной линии
Mdh1	Mdh2	Mdh3	Mmm	Mdh4	Mdh5	
6/6	6/6	16	M	12	12	A 239
6/6	3/3	16	M	12	12	CM 7
6/6	6/6	16	M	12	12	F 2
6/6	6/6	18	M	12	15	F 1444
6/6	3/3	18	M	12	12	CO 158
1/1	3/3	16	M	12	12	F 252
6/6	4,5/4,5	16	M	12	12	W 401

6.1.2 Расшифровка зимограмм

Для опознавания аллелей в локусах Mdh1, Mdh2 и Mdh3 используют SGE при pH 6,5. Для опознавания аллелей в локусах Mdh4 и Mdh5 используют вторую систему электрофореза: SGE при pH 5,0.

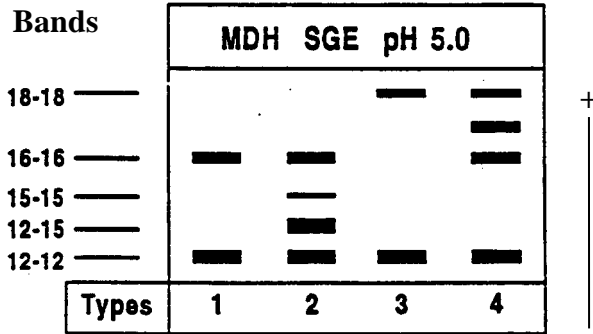


Genotypes

Types	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Genes																		
Mdh5	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	15/15	12/12	12/12	12/12	12/12
Mdh4	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Mmm	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M
Mdh3	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	18/18	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
Mdh2	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	3/3	3/4,5	3/3	3/6	3/3	3/3	3/3	3/3	3/4,5	3/6	3/4,5	3/6	4,5/6
Mdh1-	6/6	6/6	6/6	1/1	1/6	6/6	6/6	6/6	1/6	1/1	1/6	1/1	1/1	1/1	6/6	6/6	1/6	6/6

bands - полосы genotypes - генотипы

Некоторые очень слабые полосы получаются как пятнистые линии, некоторые полосы перекрываются и не могут быть получены как отличимые полосы.



Genotypes

Genes	1	2	3	4
Mdh5	12/12	15/15	12/12	12/12
Mdh4	12/12	12/12	12/12	12/12
Mdh3	16/16	16/16	18/18	16/18

6.2 Идентификация аллелей, кодирующих IDH

6.2.1 Генетическая интерпретация зимограмм

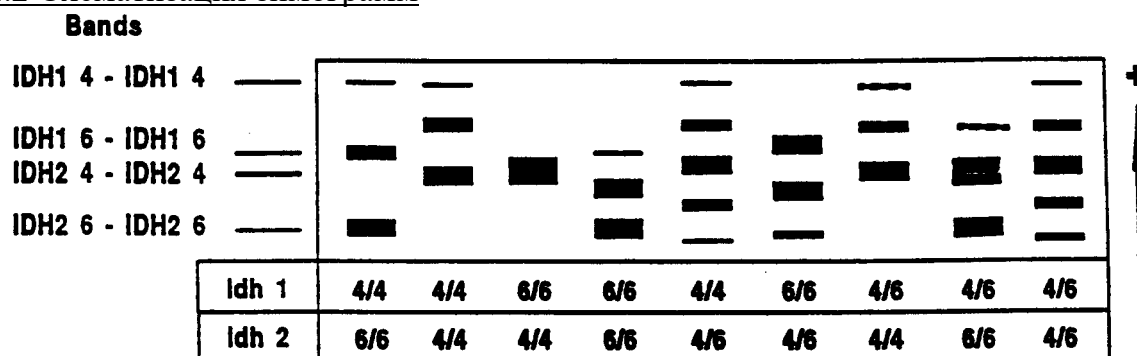
Фермент	Четвертичная структура	Хромосома	Локус	Аллели	
Изоцитратдегидрогеназа (IDH)	Димерная	8 6	Idh1 Idh2	4; 6 4; 6	Интергенные взаимодействия

Имеют место взаимодействия между продуктами генов (полипептидными субединицами), закодированными Idh1, Idh2.

Генотип		Пример инбредной линии
Idh1	Idh2	
4/4	4/4	F 16
4/4	6/6	A 632
6/6	4/4	F 1110

6/6	6/6	CO 158
-----	-----	--------

6.2.2 Схематизация зимограмм



Некоторые очень слабые полосы получаются как пятнистые линии, некоторые полосы перекрываются и не могут быть получены как отличимые полосы.

6.3 Идентификация аллелей, кодирующих PGD

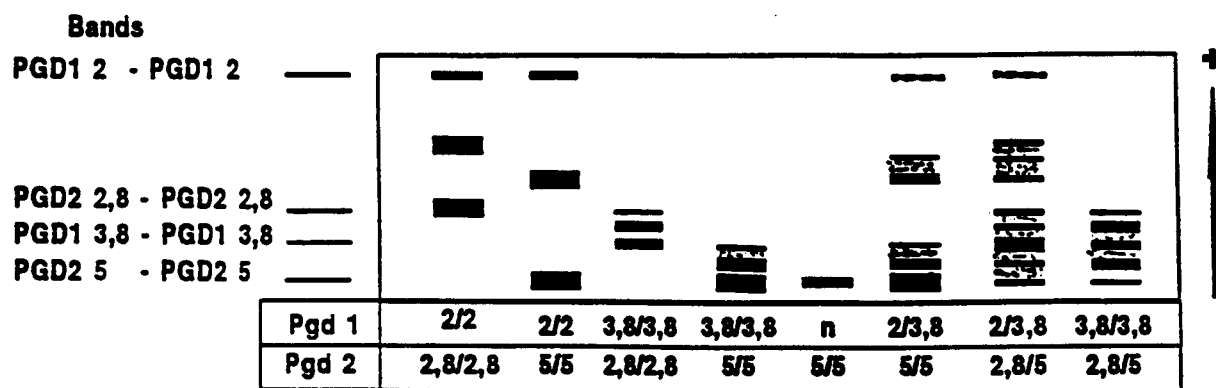
6.3.1 Генетическая интерпретация зимограмм

Фермент	Четвертичная структура	Хромосома	Локус	Аллели	
6-фосфоглюконатдегидрогеназа (PGD)	Димерная	6 3 L	PGD1 PGD2	2; 3,8 n 2,8; 5	Интергенные взаимодействия

Имеют место взаимодействия между продуктами генов (полипептидными субединицами), закодированными Pgd1, Pgd2.

Генотип		Пример инбредной линии
Pgd 1	Pgd 2	
2/2	5/5	A 239
3,8/3,8	2,8/2,8	A 632
3,8/3,8	5/5	F 2
n/n	5/5	H 108

6.3.2 Расшифровка зимограмм



Некоторые очень слабые полосы получают как пятнистые линии, некоторые полосы перекрываются и не могут быть получены как отличимые полосы.

6.4 Идентификация аллелей, кодирующих PGM

6.4.1 Генетическая интерпретация зимограмм

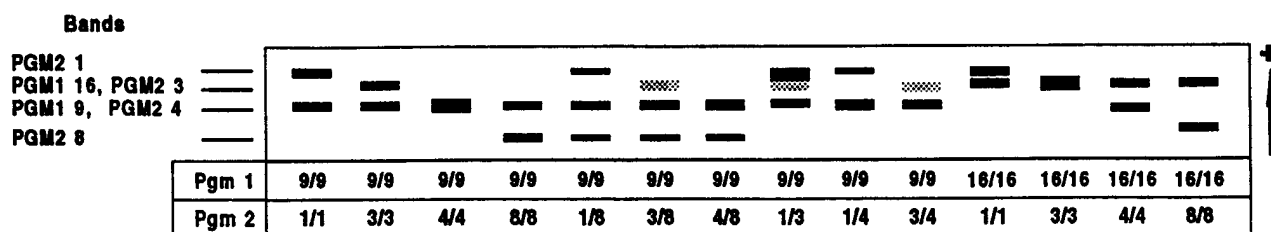
Фермент	Четвертичная структура	Хромосома	Локус	Аллели
Фосфоглюкомутаза (PGM)	Мономерная	1L	Pgm1	9; 16
	Мономерная	5S	Pgm2	1
				3
				4
				8

Генотип		Пример инбредной линии
Pgm1	Pgm2	
9/9	1/1	F 2
9/9	3/3	F 16
9/9	4/4	A 632
9/9	8/8	M 017

Примечание к PGM

Комбинации аллелей 9/9+1/1, 9/9+1/4 и 9/9+1/3, комбинации аллелей 9/9+3/3, 9/9+1/3 и 9/9+3/4, 16/16+4/4 и 9/16+3/4, комбинации аллелей 9/9+1/1, 9/9+4/4 и 9/9+3/4 и комбинации аллелей 9/9+8/8, 9/9+3/8 и 9/9+4/8 соответственно дают идентичные или очень похожие зимограммы. Поэтому в признаке 42.1 индекс 1 может быть также 9/9+1/4 или 9/9+1/3 индекс 2 может быть также 9/9+1/3 или 9/9+3/4 или 9/16+3/4 индекс 3 может быть также 9/9+3/4 индекс 4 может быть также 9/9+3/8 или 9/9+4/8

6.4.2 Расшифровка зимограмм



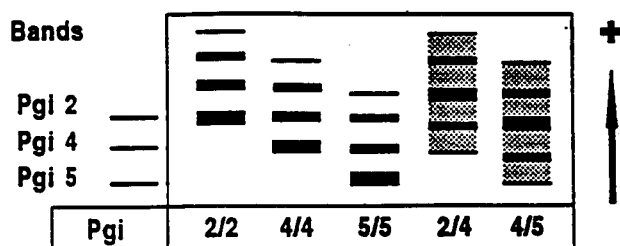
6.5 Идентификация аллелей, кодирующих PGI

6.5.1 Генетическая интерпретация зимограмм

Фермент	Четвертичная структура	Хромосома	Локус	Аллели
Фосфоглюкоизомераза (PGI)	Димерная	1L	Pgi1	4 5

Генотип	Пример инбредной линии
Pgi1	
4/4	A 239
5/5	A 632

6.5.2 Расшифровка зимограмм



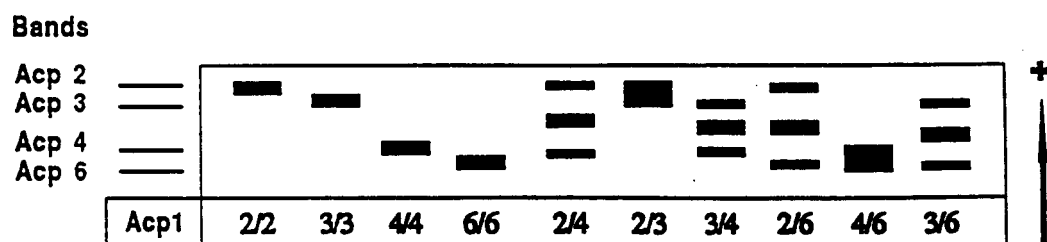
6.6 Идентификация аллелей, кодирующих АСР

6.6.1 Генетическая интерпретация зимограмм

Фермент	Четвертичная структура	Хромосома	Локус	Аллели
Ацетил-фосфотаза (АСР)	Димерная	9L	Asp1	2 3 4 6

Генотип	Пример инбредной линии
Asp1	
2/2	F 2
3/3	A 239
4/4	A 632
6/6	F 1444

6.6.2 Расшифровка зимограмм



Некоторые полосы перекрываются и не могут быть получены как отличимые полосы.

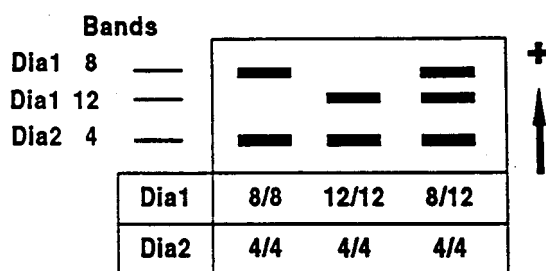
6.7 Идентификация аллелей, кодирующих DIA

6.7.1 Генетическая интерпретация зимограмм

Фермент	Четвертичная структура	Хромосома	Локус	Аллели
Диафороза (DIA)	Мономерная	2	Dia1	2 8
	Димерная	1L	Dia2	4

Генотип		Пример инбредной линии
Dia1	Dia2	
8/8	4/4	F 2
12/12	4/4	Co 158

6.7.2 Расшифровка зимограмм



Примечание к АСП

Аллели 3/3 и 2/3 и аллели 2/2 и 3/3 соответственно дают очень похожие зимограммы. Поэтому в признаке 44.1 индекс 1 может быть 2/2 или 2/3 и индекс 2 может быть 3/3 или 2/3.

Аллели 4/4 и 4/6 и аллели 6/6 и 4/6 соответственно дают очень похожие зимограммы. Поэтому в признаке 44.1 индекс 3 может быть 4/4 или 4/6 и индекс 4 может быть 6/6 или 4/6.

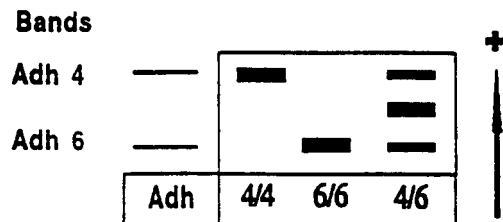
6.8 Идентификация аллелей, кодирующих ADH

6.8.1 Генетическая интерпретация зимограмм

Фермент	Четвертичная структура	Хромосома	Локус	Аллели
Алкоголь-дегидрогеназа (ADH)	Димерная	1L	Adh1	4 6

Генотип	Пример инбредной линии
Adh1	
4/4	F 1444
6/6	F 2

6.8.2 Расшифровка зимограмм



Описание эталонных линий и гибридов

inbred lines	M	M	M	M	M	M	I	I	P	P	P	P	P	A	D	A
lignées endo-	d	d	d	m	d	d	d	d	g	g	g	g	g	c	i	d
games	h	h	h	m	h	h	h	h	d	d	m	m	i	p	a	h
Inzuchtlinien	1	2	3		4	5	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1
A239	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	2/2	5/5	9/9	4/4	4/4	3/3	8/8	4/4
A632	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	2,8/2,8	9/9	4/4	5/5	4/4	8/8	4/4
CM7	6/6	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/3	4/4	4/4	12/12	4/4
CO158	6/6	3/3	18/18	MM	12/12	12/12	6/6	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	4/4	12/12	4/4
F1110	6/6	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	6/6	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	3/3	4/4	3/3	8/8	4/4
F1444	6/6	6/6	18/18	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/3	4/4	6/6	8/8	4/4
F16	1/1	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	3/3	4/4	2/2	8/8	4/4
F2	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	15/15	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	1/1	4/4	2/2	8/8	6/6
F252	1/1	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	3/3	12/12	4/4
H108	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	n/n	5/5	9/9	8/8	4/4	2/2	8/8	4/4
MO17	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	8/8	4/4	2/2	8/8	4/4
W401	6/6	4,5/4,5	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	2/2	5/5	9/9	3/3	4/4	2/2	8/8	4/4

Hybrids	M	M	M	M	M	M	I	I	P	P	P	P	P	A	D	A
Hybrides	d	d	d	m	d	d	d	d	g	g	g	g	g	c	i	d
Hybriden	h	h	h	m	h	h	h	h	d	d	m	m	i	p	a	h
	1	2	3		4	5	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1
ARTIST	1/1	3/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	2,8/5	9/9	4/4	4/5	4/4	8/8	4/4
AXON	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	1/4	4/4	2/2	8/8	4/6
AZUR	6/6	3/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/4	4/4	2/3	8/8	4/4
BASTION	6/6	3/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	4/4	8/12	4/6
BEKEFIX	6/6	4,5/6	16/18	MM	12/12	12/15	4/4	6/6	2/3,8	5/5	9/9	1/3	4/4	2/4	8/8	4/6
		3/6	16/16			12/12										
BONNY	1/6	3/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/6	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/4	4/4	3/4	8/8	4/4
	6/6											4/4	4/5	3/3		4/6
BRISTOL	1/1	3/6	16/16	MM	12/12	12/15	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	1/4	4/4	2/2	8/8	4/6
CONTESSA	6/6	3/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	6/6	3,8/3,8	5/5	9/9	3/4	4/4	4/6	8/12	4/4
FIGARO	6/6	3/6	16/18	MM	12/12	12/12	4/4	4/4	3,8/3,8	5/5	9/9	3/4	4/4	3/4	8/8	4/4
FURIO	6/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/6	2/3,8	2,8/5	9/9	4/8	4/4	4/4	8/12	4/4
LOGT	1/6	3/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/8	4/4	2/4		
MARSHALL	1/6	3/3	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	3/4	8/8	4/4
OCCITAN	1/6	3/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/6	2/3,8	5/5	9/9	4/8	4/4	2/4	8/12	4/4
ROBIN	6/6	3/4,5	16/16	MM	12/12	12/15	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	1/3	4/4	2/4	8/8	4/4
TAU	1/6	3/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	5/5	9/9	4/4	4/4	3/4	8/8	6/6
								6/6				1/4		2/3		
TEKILA	1/6	6/6	16/16	MM	12/12	12/12	4/4	4/6	3,8/3,8	2,8/5	9/9	4/4	4/4	2/2	8/8	4/4

Примечания к эталонным гибридам

У трехлинейных гибридов Векеfix, Вонну и Тау некоторые локусы имеют разделение.