

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ САМООПЫЛЕННЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

© 2017 А.Ю. Паритов<sup>1</sup>, Б.А. Алоева<sup>2</sup><sup>1</sup>Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, г. Нальчик<sup>2</sup>ООО «ИНВИТРО», г. Нальчик

Статья поступила в редакцию 21.09.2017

В Российской Федерации валовые сборы зерна кукурузы в последние годы значительно уменьшились. Основные причины – сокращение посевов зерновой кукурузы, незначительная площадь на орошаемых землях; слабое внедрение высокопродуктивных гибридов, особенно ранних и средне-ранних сроках созревания; отсутствие налаженного семеноводства гетерозисных гибридов. По питательности зерна по сравнению с другими растениями кукуруза стоит значительно выше. Зерно ее широко используют для кормовых (около 65% мирового производства), продовольственных целей (более 25%) и на сырье для промышленности (10%). Классическими методами селекции создано огромное количество ценного селекционного материала. Селекционный процесс, проводимый традиционными методами, может затягиваться в среднем до 15 лет. Внедрение инновационных технологий молекулярно-генетической оценки селекционного материала в семеноводческий процесс даст возможность существенно сократить время создания форм с заданными свойствами, манипулируя непосредственно генетическим материалом. Анализ и классификация огромного резерва изменчивости, выявляемого на уровне ДНК и обусловливающего генетическое разнообразие селекционного материала, является исключительно актуальным для селекции, так как часть этих нуклеотидных изменений, их комбинации в итоге определяют фенотипическую изменчивость. Самым простым информативным методом анализа генетического разнообразия селекционного материала может служить RAPD-анализ. Он позволяет амплифицировать различные участки ДНК с неизвестной локализацией в геноме. Данный метод основан на использовании одного или более произвольных олигонуклеотидных праймеров, где функцию прямого и обратного праймеров выполняет один и тот же олигонуклеотид. В результате ПЦР с произвольными праймерами образуются спектр уникальных, часто полиморфных фрагментов геномной ДНК. Определение генетических дистанций между линиями облегчит подбор родительских пар в гибридных комбинациях и, возможно, позволит прогнозировать гетерозис без многолетних полевых испытаний.

*Ключевые слова.* Праймер, RAPD-метод, генетический анализ, многопчатковость.

Наряду с традиционными оценками исходного материала кукурузы использование современных методов, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР) с произвольными праймерами, позволяет выявить различия даже между близкородственными линиями. Благодаря этому можно получать более надежную классификацию исходного материала. Внедрение методов и концепций молекулярной генетики в разные области биологии, медицины и сельского хозяйства переводит на новую ступень общий уровень их развития и характеризуется высокой результативностью, как в научном, так и в прикладном аспектах. Селекция растений на сегодня переживает эпоху направленных генетических изменений. Прямым следствием современного этапа в развитии молекулярной генетики является разработка биотехнологий, которые дополняют традиционные методы селекции.

*Паритов Анзор Юрьевич, кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой физиологии, генетики и молекулярной биологии. E-mail: Paritov@mail.ru*  
*Алоева Бэлла Арзуевна, администратор.*

На современном этапе неотъемлемой характеристикой селекционного материала является его генетический паспорт. Применение в селекционных работах, наряду с традиционными методами новых технологий молекулярно-генетического анализа, играет основную перспективную роль в оптимизации селекционных процессов. В частности, их применение даст возможность предпосевной лабораторной оценки исходного селекционного материала при формировании гибридных комбинаций, позволит значительно сократить время их подбора и, в конечном счете, создать генотипы с заданными свойствами [1].

Анализ и классификация огромного резерва изменчивости, выявляемого на уровне ДНК и обусловливающего генетическое разнообразие селекционного материала, является исключительно актуальным для селекции, так как часть этих нуклеотидных изменений, их комбинации в итоге определяют фенотипическую изменчивость [2].

Самым простым информативным методом анализа генетического разнообразия селекционного материала может служить RAPD-анализ. Он

позволяет амплифицировать различные участки ДНК с неизвестной локализацией в геноме. Данный метод основан на использовании одного или более произвольных олигонуклеотидных праймеров, где функцию прямого и обратного праймеров выполняет один и тот же олигонуклеотид. В результате ПЦР с произвольными праймерами образуются спектр уникальных, часто полиморфных фрагментов геномной ДНК [3].

В связи с этим, возникает необходимость в систематизации этого материала, направленного на отбор наилучших из них. Тестирование линий требует проведения значительного объема работ, в связи с чем, желателен вовлекать в скрещивание только лучшие по агрономическим показателям и генетически разнообразные линии с прогнозированной их высокой ценностью. Скрещивание генетически близких линий является неэффективным путем поиска перспективных гибридных комбинаций. Выявить генетическую близость или отдаленность линий, основываясь только на данных морфологических признаков – проблематично. Наряду с традиционными оценками исходного материала кукурузы использование современных методов, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР) с произвольными праймерами, позволяет выявить различия даже между близкородственными линиями. Благодаря этому можно получать более надежную классификацию исходного материала. Анализ произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) позволит изучить генетическое разнообразие линий кукурузы. Кроме того, можно оптимизировать подбор линий для скрещивания и повысить эффективность традиционного селекционного процесса [4].

**Цель работы:** молекулярно-генетическое исследование самоопыленных линий кукурузы с помощью RAPD-метода.

Впервые был проведен молекулярно-генетический анализ линий кукурузы селекции кафедры общей генетики, селекции и семеноводства КБГУ и их родительского сорта Юбилейная-50 с получением уникальных спектров фрагментов ДНК RAPD-методом по каждому исследуемому образцу. Были установлены генетические дистанции между самоопыленными линиями кукурузы и сортом Юбилейная-50 [5,6].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализе были использованы самоопыленные линии кукурузы, полученные с применением химических мутантов нитрозоэтилмоче-

вины (НЭМ) и нитрозометилмочевины (НММ) в концентрациях 0,01 и 0,025%, под руководством профессоров К.Н.Керефова и М.К.Керефовой и их родительская форма – сорт Юбилейная-50. С целью установления чистоты линий при ручном опылении на молекулярном уровне семена линии 8 были взяты с початков двух разных рядов одной и той же линии 8 [7].

Ниже дается характеристика 8 линий, которые были использованы в нашей работе:

Линия 4. Линия среднеспелая, длина вегетационного периода в 128-135 дней. Растение высотой 200-210 см, высота прикрепления верхнего початка 100-108 см. Устойчивость против полегания средняя. Початок массой 81-85 г, длиной 10-15 см. Рядов зерен на початке 12-14, число зерен в ряду 25-28 штук. Зерно и стержень початка белые. Зерно зубовидное. Число початков с растения - 2,2.

Линия 6. Линия среднепоздняя, длина вегетационного периода в 130-145 дней. Растение высотой 100-108 см, высота прикрепления верхнего початка 35-40 см. Устойчивость против полегания средняя. Початок массой 82-85 г, длиной 10-15 см. Рядов зерен на початке 12-14, число зерен в ряду 23-25 штук. Зерно и стержень початка белые. Число початков с растения - 1,9.

Линия 8. Линия среднеспелая, длина вегетационного периода в среднем 125-130 дней. Растение высотой 130-135 см, высота прикрепления верхнего початка 41-48 см. Устойчивость против полегания средняя. Початок массой 77-85 г, длиной 13-15 см. Рядов зерен на початке 14-16, число зерен в ряду 20-25 штук. Зерно и стержень початка белого цвета. Зерно зубовидное. Число початков с растения - 1,9.

Линия 9. Растение высотой 260-270 см, высота прикрепления верхнего початка 93 – 100 см. Устойчивость против полегания средняя, средняя засухоустойчивость. Длина початка 11 – 13 см. Рядов зерен на початке 12, число зерен в ряду 20-23 штук. Длина метелки 33-38, количество боковых веточек 17. Количество листьев на стебле 10-12. Зерно белое кремнистое. Стержень початка белый. Число початков с растения – 1,8.

Линия 14. Линия среднеспелая, длина вегетационного периода колеблется в среднем 123-128 дней. Растение высотой 208-212 см, высота прикрепления верхнего початка 92-98 см. Початок массой 86-88 г, длиной 16-18 см. Число рядов 10-12, число зерен в ряду 30-38 штук. Зерно и стержень початка белого цвета. Зерно кремнистое. Число початков с растения - 1,8.

Линия 20. Растение высотой 270-280 см, высота прикрепления верхнего початка 95 – 105

см. Устойчивость против полегания средняя, средняя засухоустойчивость. Длина початка 15 – 18 см. Рядов зерен на початке 10-12, число зерен в ряду 25-28 штук. Длина метелки 45-50, количество боковых веточек 19. Количество листьев на стебле 11-12. Зерно белое кремнистое. Стержень початка белый. Число початков с растения – 2,0.

Линия 28. Линия среднеспелая, длина вегетационного периода в среднем составляет около 130 дней. Растение высотой 205-210 см, длина прикрепления верхнего початка 96-98 см. Устойчивость против полегания средняя. Початок массой 85-90 г, длиной 15-19 см. Рядов зерен на початке 10-12, число зерен в ряду 28-30 штук. Зерно и стержень початка белого окраса. Зерно зубовидное. Число початков с растения – 1,8.

Линия 30. Линия среднеспелая, длина вегетационного периода в среднем составляет около 130 дней. Растение высотой 185-192 см, длина прикрепления верхнего початка 80-83 см. Устойчивость против полегания средняя. Початок массой 71-76 г, длиной 15-21 см. Число рядов 12-14, число зерен в ряду 25-30 штук. Зерно и стержень початка белого цвета. Зерно зубовидное. Число початков – 2,1.

Выделение ДНК проводилось двумя способами: 1) методом тризольного выделения с хлороформаной очисткой; 2) готовыми наборами для выделения ДНК из растительного материала «ДНК-сорб-С». ДНК выделяли из трех-, пятидневных проростков, пророщенных в лабораторных условиях. Семена перед проращиванием предварительно обрабатывали 70%-ным этанолом для исключения экзогенной микрофлоры.

Молекулярно-генетический анализ опытных самоопыленных линий кукурузы в работе проводился методом анализа полиморфизма амплифицированных неспецифическими праймерами фрагментов ДНК. В результате предварительного скрининга были выбраны 6 информативных RAPD-праймеров.

ПЦР проводилась в амплификаторе MyCycler (Bio-Rad, США).

Объем реакционной смеси составлял 20 мкл.

В результате проведенной оптимизации были выбраны следующие условия амплификации. На начальном этапе проводилась денатурация ДНК при 94°C, после чего следовали 25 – 30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 40 сек при 94°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 1 мин 30 сек при температуре от 54 до 72°C (в зависимости от длины и нуклеотидных последовательностей, использованных праймеров), и стадию элонгации в течение 1 мин 30 сек при температуре 72°C, которая оптимальна для активности Taq-полимеразы. В некоторых случаях, для оптимизации ПЦР и уменьшения количества неспецифических продуктов амплификации использовалась специальная процедура, получившая название «горячего старта». При этой процедуре добавление Taq-полимеразы, разбавленной в 10 мкл соответствующего 1-кратного буфера, в реакционную смесь осуществлялась только после нагрева последней до 94°C, что исключало возможность неспецифического отжига праймеров на нуклеотидных последовательностях с низкой гомологией. По завершению амплификации из реакционной смеси отбирали аликвоту объемом 10 мкл и анализировали в 1,5%-ном агарозном геле.

Процесс электрофоретического фракционирования препаратов ДНК осуществляли в 1,5%-ном агарозном геле. Источником питания служили приборы модели 150/2.5 фирмы Bio-Rad (США).

Агарозный гель-электрофорез осуществлялся в приборах подводного типа MINI-CUB Cell GT (Bio-Rad, США). Толщина используемых в различных экспериментах гелей варьировала незначительно от 2 до 4 мм. Гребенки для формирования колодцев имели толщину 1,5 мм и отличались шириной зубчиков (от 3 мм до 8 мм). В лунки вносилось по 4 мкл ПЦР-продукта. В качестве буферной системы использовали TAE-буфер, содержащий 40 мМ трис-ацетата (рН 7,6) и 2 мМ ЭДТА.

Опытным путем было установлено, что при электрофорезе оптимальными условиями является 50 V в течение 120 минут.

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности RAPD-праймеров

№	Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
1	OPA 01	CAGGCCCTTC
2	OPA 02	TGCCGAGCTG
3	OPA 08	GTGACGTAGG
4	OPH 07	CTGCATCGTG
5	OPH 13	GACGCCACAC
6	OPF 06	GGAATTCGG

После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 10 мин. Флуорисценцию нуклеиновых кислот наблюдали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм в трансиллюминаторе UVP (BioDoc-ITTM, Imaging System). Нуклеиновые кислоты, окрашенные бромидом этидия светились оранжево-красным светом. В работе использовался маркер молекулярного веса Axugen Low Range DNA Marker.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На продуктивность амплификации, уровень свечения ампликонов, наличие артефактных зон на электрофореграмме в большой степени может оказывать влияние степень чистоты, выделенной ДНК, т.е. наличие в реакционной смеси белков, липидов, и иных ингибиторов амплификации.

В связи с этим выделение ДНК осуществлялось двумя способами для того, чтобы установить возможное влияние метода выделения на количественный выход продуктов амплификации и, следовательно, на качество электрофореграмм при визуализации результатов ПЦР.

По результатам пробной амплификации была видна существенная разница в качестве

электрофореграмм в зависимости от методы выделения. Наиболее четко ампликоны визуализируются при методе выделения готовыми наборами для выделения ДНК из растительного материала «ДНК-сорб-С». В дальнейшей работе использовались образцы ДНК, выделенные этим методом.

Молекулярно-генетический анализ самоопыленных линий кукурузы селекции КБГУ был проведен серией RAPD-праймеров. По результатам амплификации были отобраны 6 наиболее информативных праймера (ОРА 01, ОРА 02, ОРА 08, ОРН 07, ОРН 13, ОРФ 06).

В RAPD анализ включены самоопыленные линии кукурузы и их родительская форма Юбилейная-50 для установления генетических дистанций между линиями и между линиями и родительской формой после обработки мутагенами и многолетнего самоопыления.

В анализ были включены образцы линии 8 с 9-го и 11-го ряда, разделенные на две подлинии по морфологическим характеристикам зерен, для подтверждения различий подлиний на генетическом уровне.

Ниже представлены результаты исследований в виде матрицы результатов амплификации по каждому праймеру на каждой линии и сорту

**Таблица 2.** RAPD-спектр линий кукурузы при использовании праймера ОРА 01

Название зоны	Номера образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОРА 01 <sup>750</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 01 <sup>500</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 01 <sup>350</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 01 <sup>300</sup>	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0

**Таблица 3.** RAPD-спектр линий кукурузы при использовании праймера ОРА 02

Название зоны	Номера образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОРА 02 <sup>1600</sup>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 02 <sup>1500</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 02 <sup>1000</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ОРА 02 <sup>600</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 02 <sup>300</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Таблица 4.** RAPD-спектр линий кукурузы при использовании праймера ОРА 08

Название зоны	Номера образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОРА 08 <sup>1000</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 08 <sup>500</sup>	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
ОРА 08 <sup>400</sup>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
ОРА 08 <sup>250</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 08 <sup>125</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Юбилейная-50. С каждой электрофореграммой идет, в которой наличие ампликона обозначается 1, его отсутствие – 0. Данные с матриц по каждому примеру были сведены в суммарную матрицу состояния бинарных признаков для построения дендрограммы, позволяющей выявить генетические дистанции между исследуемыми образцами. (Таблица 2. 1-Юбилейная-50; 2-линия 4; 3-линия 6; 4-линия 8 (9 ряд); 5-линия 8 (11 ряд); 6- маркер; 7- линия 9; 8- линия 14; 9- линия 20; 10- линия 28; 11- линия 30; 12- «-» контроль).

По локусам ОРА 01<sup>750</sup>, ОРА 01<sup>500</sup>, ОРА 01<sup>350</sup> ампликоны выявлены у всех исследуемых образцов.

По локусу ОРА 01<sup>300</sup> у Юбилейной-50, линий 4, 6, 8 (9), 28, 30 ампликоны не выявлены. Ампликоны выявлены у линий 8 (11), 9, 14, 20.

Выявляется различие между подлиниями 8 (9) и 8 (11).

По локусам ОРА 02<sup>1500</sup>, ОРА 02<sup>600</sup>, ОРА 02<sup>300</sup> ампликоны выявлены у всех исследуемых образцов (Таблица 3. 1-Юбилейная-50; 2-линия 4; 3-линия 6; 4-линия 8 (9 ряд); 5-линия 8 (11 ряд); 6- линия 9; 7- линия 14; 8- линия 20; 9- линия 28; 10- линия 30; 11- маркер).

По локусу ОРА 02<sup>1600</sup> ампликоны выявлены у Юбилейной-50, линий 6, 8 (9), 8 (11), 9, 14, 20, 28, 30. У линии 4 ампликон не выявлен.

По локусу ОРА 02<sup>1000</sup> ампликоны выявлены у линий 28 и 30. У линий Юбилейной-50, линий 4, 6, 8 (9), 8 (11), 9, 14, 20 ампликоны не выявлены.

По локусам ОРА 08<sup>1000</sup>, ОРА 08<sup>250</sup>, ОРА 08<sup>125</sup> ампликоны выявлены у всех образцов (Таблица 4. 1- маркер; 2-Юбилейная-50; 3-линия 4; 4-линия 6; 5-линия 8 (9 ряд); 6-линия 8 (11 ряд); 7- линия 9; 8- линия 14; 9- линия 20; 10- линия 28; 11- линия 30; 12- «-» контроль).

По локусу ОРА 08<sup>500</sup> ампликоны выявлены у линий 9, 14, 20, 28. У Юбилейной-50, линий 4, 6, 8 (9), 8 (11), 30 ампликоны не выявлены.

По локусу ОРА 08<sup>400</sup> ампликоны выявлены у Юбилейной-50, линий 4 и 30. У линий 6, 8 (9), 8 (11), 9, 14, 20, 28 ампликоны не выявлены.

По локусам ОРН 07<sup>500</sup>, ОРН 07<sup>350</sup> ампликоны выявлены у всех образцов.

По локусу ОРН 07<sup>750</sup> ампликоны выявлены у Юбилейной-50, линий 4, 6, 8 (9 ряд), 14, 20, 30. У линий 8 (11), 9, 28 ампликоны не выявлены. Выявляются различия между подлиниями 8 (9) и 8 (11) (Таблица 5. 1- маркер; 2-Юбилейная-50; 3-линия 4; 4-линия 6; 5-линия 8 (9 ряд); 6-линия 8 (11 ряд); 7- линия 9; 8- линия 14; 9- линия 20; 10- линия 28; 11- линия 30; 12- «-» контроль).

По локусу ОРН 07<sup>125</sup> ампликоны выявлены у Юбилейной-50, линий 4 и 30. У линий 6, 8 (9 ряд), 8 (11), 9, 14, 20, 28 ампликоны не выявлены.

По локусам ОРН 13<sup>600</sup>, ОРН 13<sup>470</sup>, ОРН 13<sup>300</sup> ампликоны выявлены у всех образцов (Таблица 5. 1-Юбилейная-50; 2-линия 4; 3-линия 6; 4-линия 8 (9 ряд); 5-линия 8 (11 ряд); 6- линия 9; 7- линия 14; 8- линия 20; 9- линия 28; 10- линия 30; 11- маркер).

По локусу ОРН 13<sup>2500</sup> ампликон выявлен только у линии 28.

По локусу ОРН 13<sup>1000</sup> ампликоны выявлены у Юбилейной-50, линий 4, 6, 8 (9), 8 (11), 9, 14, 20, 30. У линий 20 и 30 ампликоны не выявлены.

По локусу ОРН 13<sup>750</sup> ампликоны выявлены у Юбилейной-50, линий 8 (9), 8 (11), 9, 14, 20.

По локусу ОРН 13<sup>125</sup> ампликон выявлен только у линий 30.

По локусам ОРФ 06<sup>350</sup>, ОРФ 06<sup>280</sup> ампликоны выявлены у всех образцов.

По локусу ОРФ 06<sup>950</sup> ампликон выявлен только у Юбилейной-50.

**Таблица 5.** RAPD-спектр линий кукурузы при использовании праймера ОРА 07

Название зоны	Номера образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОРА 07 <sup>750</sup>	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
ОРА 07 <sup>500</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 07 <sup>350</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА 07 <sup>125</sup>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1

**Таблица 6.** RAPD-спектр линий кукурузы при использовании праймера ОРА 13

Название зоны	Номера образцов									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ОРФ 06 <sup>950</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ОРФ 06 <sup>500</sup>	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
ОРФ 06 <sup>350</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРФ 06 <sup>280</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

По локусу OPF 06<sup>500</sup> ампликоны выявлены у Юбилейной-50, линий 4, 6, 28, 30. У линий 8 (9), 8 (11), 9, 14, 20 ампликоны не выявлены (Таблица 6. 1- маркер; 2-Юбилейная-50; 3-линия 4; 4-линия 6; 5-линия 8 (9 ряд); 6-линия 8 (11 ряд); 7-линия 9; 8- линия 14; 9- линия 20; 10- линия 28; 11- линия 30; 12- «-» контроль).

В ходе исследований выявлено и проанализировано 29 локусов. Размеры полученных ампликонов варьировали в пределах от ~125 до ~2500 п.н..

Для Юбилейной-50 выявлен уникальный ампликон по локусу OPF 06 950, который в дальнейшем может служить маркером для идентификации данного сорта.

Выявлены различия между подлиниями 8 (9) и 8 (11), что говорит о гетерогенности этой линии. На основании результатов анализа считаем необходимым выделение их в самостоятельные линии.

На основании суммарной матрицы RAPD-спектров с помощью программы Treesonw определены генетические дистанции между самоопыленными линиями кукурузы селекции КБГУ и родительским сортом Юбилейная-50.

Под действием химических мутагенов и многолетнего самоопыления линии приобрели специфичные нуклеотидные последовательности, что и обуславливает выявление специфического для каждой линии RAPD-спектра ДНК фрагментов и определяет генетические дистанции на дендрограмме.

На дендрограмме видно, что после многолетней селекции более всего отличаются от исходной родительской формы линии 8 и 9. Более сходны с родительской формой линии 4, 6 и 30. Наибольшая генетическая дистанция выявлена между линиями 4 и 9.

На основе полученных данных возможно дальнейшее проведение полевых опытов по установлению обоснованности прогнозирования гетерозиса по результатам RAPD-анализа и выявленных генетических дистанций [9].

Полученные спектры RAPD-фрагментов для каждой опытной линии кукурузы позволят их в дальнейшем идентифицировать, дифференцировать и проводить сравнительный молекулярно-генетический анализ с аналоговыми линиями других источников, а также, по литературным данным, даст возможность прогнозировать гетерозис на основе генетических дистанций по результатам молекулярно-генетических исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для анализа были подобраны 6 RAPD праймеров. В ходе исследований выявлено и проанализи-

зировано 29 локусов. Для каждого исследуемого образца получен уникальный спектр ДНК фрагментов RAPD-методом. По локусу OPF 06 950 выявлен уникальный ампликон Юбилейной-50, который в дальнейшем может служить частью маркерной системы для идентификации данного сорта [10].

В ходе работы установлено, что после действия мутагенов и многолетней селекции более всего отличаются от исходной родительской формы линии 8 и 9. Более сходны с родительской формой линии 4, 6 и 30. Наибольшая генетическая дистанция выявлена между линиями 4 и 9.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культ. растений. 2002. Т. 34. № 4. С. 279-296.
2. Доменюк В.П., Белоусов А.О., Сиволап Ю.М. Отбор по ДНК- маркерам QTL в популяциях кукурузы // Сборник материалов 2-й Международной конференции молодых ученых «Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений». Харьков, 2003. С. 32.
3. Дугарь Ю.М., Попов В.М. RAPD-анализ украинских сортов клевера лугового (*Trifolium pretense* L.) разного эколого-географического происхождения // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Серия: биология. 2011. Вип. 13. № 947. С. 81-86.
4. Хавкин Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур // С.-х. биология. 2003. № 3. С. 26-41.
5. Айшаева З.М., Алоева Б.А., Паритов А.Ю. От традиционной селекции к селекции при помощи ДНК-маркеров // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. № 1(4). С. 761- 763.
6. Паритов А.Ю., Кереева М.К. Методы определения генетических параметров на основе диаллельных скрещиваний // Вестник КБГУ, серия биологические науки. 2006. Вып. 8. Нальчик. С. 109-111.
7. Кереев К.Н., Кереева М.К. Селекция кукурузы в Кабардино-Балкарии // Изучение и опыт возделывания кукурузы в Кабардино-Балкарии. Нальчик: Издательство КБГСХА. 2001. 277 с.
8. Паритов А.Ю., Тхагансоева Р.В. Роль химических мутагенов в селекции кукурузы на многопочатковость // Периодический научный журнал «Современные тенденции развития науки и технологии». Белгород, 2017, № 1. Ч. 2. С. 93– 95.
9. Современные методы селекции самоопыленных линий кукурузы / А.Ю. Паритов, Р.В. Тхагансоева, О.С. Кажарова, С.К. Бозиева // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/>

- view?id=24531 (дата обращения 08.06.2017).
10. Паритов А.Ю. Роль селекции на многопчатковость в повышении урожайности кукурузы // Международный научный институт «Educatio» (International Scientific Institute “Educatio”). 2015. Ч.6. № 3(10). С. 148-149.

### MOLECULAR GENETIC ANALYSIS SAMOILENKI LINES OF MAIZE

© 2017 A.Y. Paritov<sup>1</sup>, B.A. Aloeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kabardino-Balkaria State University named after H.M. Berbekov, Nalchik

<sup>2</sup> LLC «INVITRO», Nalchik

In the Russian Federation, the gross grain harvest of corn in recent years has declined. The main causes of reduction of crops of grain corn, a minor area on irrigated land; weak introduction of high-yielding hybrids, especially the early and medium early in maturing; the lack of established seed production of heterotic hybrids. On the nutritional value of the grain compared to other maize plants is much higher. Grain it is widely used for feed (about 65% of world production), food purposes (over 25%) and raw materials for industry (10%). Classical breeding methods have created a huge amount of valuable breeding material. Selection process conducted by traditional methods, may take on average up to 15 years. The introduction of innovative technologies of molecular genetic evaluation of breeding material in the seed process will provide an opportunity to significantly reduce the time of creation of forms with desired properties, directly manipulating of genetic material. Analysis and classification of a huge reserve of variability detected at the DNA level and the underlying genetic diversity of breeding material is highly relevant for breeding because of these nucleotide modifications, and their combination in the end determine phenotypic variability. The most simple informative method of analysis of genetic diversity in breeding material can serve as a RAPD analysis. It allows you to amplify different stretches of DNA with unknown localization in the genome. This method is based on using one or more arbitrary oligonucleotide primers, where the forward and reverse primers performs the same oligonucleotide. The result of PCR with arbitrary primers formed a range of unique, often polymorphic fragments of genomic DNA. Determination of genetic distances between lines will facilitate the selection of parental pairs in hybrid combinations and may help to predict heterosis without years of field testing.

*Keywords.* Primer, RAPD method, genetic analysis, multipointness.