

ЛАБОРАТОРНЫЙ СОРТОВОЙ КОНТРОЛЬ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ЗЕРНА

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	2
1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ.....	4
1.1. Что такое электрофорез?.....	4
1.2. Типы электрофореза.....	5
1.3. Выбор белков для использования в сортовом контроле.....	6
2. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ.....	7
2.1. Система регистрации и интерпретация результатов электрофореза.....	8
2.2. Генетический контроль электрофоретических компонентов гордеинов.....	9
3. МЕТОДИКА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ГОРДЕИНОВ ЯЧМЕНЯ В КРАХМАЛЬНОМ ГЕЛЕ.....	13
3.1. Оборудование.....	13
3.2. Реактивы.....	15
3.3. Отмывание крахмала.....	15
3.4. Гидролиз крахмала.....	16
3.5. Приготовление фиксирующего и красящего растворов для визуализации белков в геле.....	17
3.6. Приготовление буфера.....	17
3.7. Приготовление крахмального геля.....	17
3.8. Приготовление экстрактов белков.....	18
3.9. Нанесение проб (экстрактов белков) на гель.....	20
3.10. Электрофорез.....	21
3.11. Интерпретация и регистрация электрофореграмм гордеинов.....	22
4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОРТОВЫХ КАЧЕСТВ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ.....	35
4.1. Выборка семян для определения сортовых качеств.....	37
4.2. Анализ гетерогенных по электрофореграммам гордеинов сортов.....	41
4.3. Дифференциация сортов по электрофоретическим спектрам гордеинов.....	42
4.4. Результаты сравнительного анализа сортовых качеств партий семенного и товарного зерна ячменя методом электрофореза.....	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	46

Введение

Федеральным Законом «О семеноводстве» наряду с апробацией и грунтовым контролем посевов предусмотрено введение лабораторного контроля сортовых качеств (проверка на соответствие сорту и определение сортовой чистоты) элитных и репродукционных семян. Однако оценка сортовой чистоты посевов путем апробации и грунтового контроля не всегда может гарантировать сортовую чистоту семян на заключительном этапе их производства. В случаях нарушения технологической дисциплины на этапах уборки, транспортировки, хранения на току, сушки и сортировки семян, возможно сортовое засорение или путаница партий семян различных сортов. В результате данные апробации и реальная чистота партий семян будут значительно отличаться. Апробация и грунтовой контроль имеют сезонный характер и в случае необходимости быстрой проверки семян на сортовую принадлежность и сортовую чистоту, например, при торговых операциях, не могут быть использованы. Для некоторых культур определение сортовой чистоты является важным не только для семенных, но и для товарных партий зерна, например, для пивоваренного ячменя. Показана зависимость между сортовой чистотой и наиболее важными для производства показателями солода: экстрактивностью, предопределяющей эффективность использования солода в производстве пива, и фриабилизностью – степенью разрыхления солода, отражающей активность его ферментов. Для обеспечения однородного и равномерного замачивания, проращивания ячменя и сушки солода необходимо иметь его сортовую чистоту выше 90% (Хлыновский, Ермолаева, Жаркова, 2007). По европейским стандартам для получения пива высокого качества сортовая чистота ячменя должна быть не ниже 95% (Таразанов, 2007).

Апробация и грунтовой контроль основываются исключительно на морфологических признаках. Поэтому к вновь создаваемым сортам предъявляются жесткие требования к выравненности по морфологическим признакам. Однако выравненность сорта по внешним признакам еще не отражает его внутренней генетической структуры. Современные сорта создаются, как правило, путем индивидуального отбора из гибридных популяций в F_2 - F_6 с последующим объединением лучших семей. В ранних поколениях присутствует значительное количество растений гетерозиготных по многим генам, по которым различались родительские формы. Искусственный отбор по морфологическим признакам позволяет быстро достичь требуемой выравненности сорта. Однако по неконтролируемым визуальным признакам (например, запасным белкам, ферментам и т.п.) многие современные сорта представляют собой популяции. В процессе первичного семеноводства, а также при длительном репродуцировании или выращивании в резко различающихся условиях таких сортов под действием естественного отбора может происходить изменение генетической структуры их популяций. Следствием изменений генетической структуры может стать изменение хозяйственных характеристик сорта. Поэтому существует необходимость использования для определения сортовых качеств семян таких методов, которые не опирались бы только на описание морфологических признаков

растений, а основывались на анализе зерновок, были быстрыми и относительно дешевыми.

Известно, что различные типы электрофореза в гелях применимы для анализа состава белков семян и могут использоваться при установлении сортовой принадлежности и сортовой чистоты семян у целого ряда культур. Для эффективной работы в этом направлении белки должны отвечать следующим требованиям:

- достаточно высокая сортоспецифичность электрофоретических спектров анализируемых белков, что предполагает, с одной стороны, наличие нескольких генов или локусов, контролирующих белки, с другой, множественный аллелизм этих генов или локусов;
- система регистрации и интерпретации электрофореграмм должна быть достаточно простой и объективной;
- электрофоретические спектры белков не должны зависеть от условий выращивания растений, длительности и условий хранения семян;
- методика электрофореза должна быть быстрой, дешевой и пригодной для проведения массовых анализов.

У ячменя на сегодняшний день этим требованиям наиболее полно удовлетворяют спирторастворимые запасные белки зерна - гордеины. Использование электрофореза гордеина позволяет быстро и эффективно определять сортовое соответствие и сортовую чистоту не только семенных, но и товарных партий большей части сортов ячменя. Однако в результате процессов сужения генетического разнообразия сортов сельскохозяйственных культур, в последнее время в Государственный реестр включается все больше сортов ячменя, которые методом электрофореза только одного белка (гордеина) различить невозможно. В связи с этим, остро стоит вопрос поиска и разработки дополнительных методов и генетических маркеров для наиболее полной дифференциации сортов, а значит точной их идентификации и определения сортовой чистоты семенных и товарных партий.

1. Общие сведения об электрофорезе

1.1. Что такое электрофорез?

Электрофорез - метод, используемый для разделения заряженных частиц под влиянием электрического поля. Этот метод впервые использовал еще в 1925 году Тизелиус. Первые эксперименты проводились в растворе (электрофорез в свободной жидкости), что делало разделение трудным для наблюдения. В 1950 г. были введены поддерживающие среды, после чего метод стал широко использоваться учеными в различных областях. Среда-носитель применяется, чтобы удерживать заряженные частицы, когда они подвергаются разделению, минимизируя, таким образом, диффузию. Существует много типов сред-носителей, включая бумагу и ацетат целлюлозы, но наиболее широко используемыми являются гели различных типов - агароза, гидролизованный картофельный крахмал, а также состоящие из синтетического полимера полиакриламида.

В биохимии электрофорез применяется для разделения смесей больших молекул, таких, как белки или нуклеиновые кислоты, которые в растворе ведут себя как заряженные частицы. Мы рассмотрим только электрофорез белков. Чтобы понять основы теории электрофореза и осознать целесообразность применения этого метода для идентификации сортов, напомним некоторые представления о структуре белка. Белки состоят из длинных цепей аминокислот. В белках найдено 20 различных аминокислот. Точная последовательность аминокислот в конкретном белке, а также число аминокислот в белке (что обуславливает его молекулярную массу), определяются генетически. Существуют тысячи различных видов белков, и все они имеют уникальную последовательность аминокислот. Из-за этого, а также из-за различной длины аминокислотных цепей, белки различаются как по электрическому заряду, так и по молекулярной массе. Оба этих параметра используются при электрофоретическом разделении. Используемые методы электрофореза в гелевых носителях (полиакриламидный и крахмальный) основаны на двух принципах:

- а) заряженные молекулы белка движутся в поле постоянного электрического тока, скорость движения зависит от величины заряда молекулы;
- б) эффект «молекулярного сита» в используемых гелях (кроме агарозного). Полиакриламидный или крахмальный гели имеют пористую структуру, в которой размер пор соизмерим с размерами белковых молекул. Поэтому при одинаковом электрическом заряде полипептиды с большей молекулярной массой в геле будут двигаться медленнее полипептидов с меньшей молекулярной массой.

Таким образом, смесь белков может быть разделена на дискретные зоны в зависимости от заряда и размера составляющих смесь молекул. Проведя электрофоретическое разделение, необходимо визуализировать белки тем или иным способом, т.к. их нельзя увидеть непосредственно. Для этого используют различные методики окрашивания. В этом состоит суть электрофоретического разделения белков, хотя описание сильно упрощено.

1.2. Типы электрофореза

Существует много версий электрофоретических методов. Все они имеют общие черты. Гель определенных размеров, но с разной величиной пор, удерживается между стеклянными пластинами или в стеклянных трубках и содержит буфер какого-либо вида (буфер геля или рабочий буфер). Ионная сила и pH буфера могут меняться, чтобы соответствовать белкам, разделение которых представляет интерес. Электродный (или резервуарный) буфер используется, чтобы переносить электрический заряд через гель. Разделение смеси белков может быть выполнено как горизонтально, так и вертикально. В ряде случаев существенным является контроль температуры геля и буфера в процессе разделения. Существует много различных типов оборудования, как промышленного производства, так и самодельных. Обычно выделяют 4 принципиально различных видов электрофореза.

1) Нативный электрофорез. Метод, в котором разделение основано на различиях как заряда белков, так и их размера. В основной версии этого метода используется один и тот же буфер как в геле (рабочий буфер), так и в электродных резервуарах (электродный буфер). Этот метод известен как непрерывный.

2) Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии детергента - додецилсульфата натрия (SDS-PAGE или ДДС-Na - ПААГЭ). При этом типе электрофореза рабочий буфер, электродный буфер и буфер исходного раствора белкового препарата, включают ДДС-Na. Было показано, что все белки, находясь в восстановленной форме, связывают ДДС-Na примерно в одной и той же пропорции (1,4 г ДДС-Na на 1 г белка, что составляет примерно 1 молекуле детергента на 2 аминокислотных остатка). Так как ДДС-Na несет сильный отрицательный заряд, он нейтрализует все положительные заряды белков. В результате разделение белков, обработанных ДДС-Na, основывается только на их размере, при условии, что белки не являются гликопротеинами. Этот вид электрофореза является ступенчатой системой (pH электродного и гелевого буферов различаются).

3) Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ). Третий вид электрофореза отличается от двух предыдущих тем, что рабочий и электродный буферы не применяются. Вместо этого в геле создается градиент pH путем добавления смеси химических соединений, известных как носители амфолитов. Величина и знак заряда белковых молекул зависят от pH раствора, в котором белки растворены. Это обусловлено структурой аминокислот, содержащих химические группы, которые могут быть как положительно, так и отрицательно заряжены. Для каждого белка существует такое значение pH, при котором число положительных и отрицательных зарядов равно, т.е. он не несет суммарного заряда. Это значение pH известно как изоэлектрическая точка или pI . При значениях pH ниже pI , белки будут иметь положительный заряд, а при pH выше pI , они будут отрицательно заряжены. В методах ИЭФ смесь белков наносится на гель, содержащий градиент pH. Когда накладывается электрическое поле, белки мигрируют в геле до тех пор, пока они не достигают точки, где значение pH геля равно значению их pI . После этого белки не могут двигаться, т.к. не несут больше заряда. Эффект становится "сфокусированным".

Из-за того, что белки, различающиеся только немного по pI , могут быть, таким образом, легко разделены, изоэлектрофокусирование так же стало эффективным средством разделения смесей белков.

4) Двумерные методы. При двумерном электрофорезе белки сначала подвергаются электрофоретическому фракционированию в первом направлении, затем гель с разделенными белками формирует стартовую зону для другого разделения, проводимого под прямым углом к первому. Такие двумерные методы являются самыми эффективными по разрешению электрофоретическими системами, особенно когда используются вместе с высокочувствительными методиками окрашивания (например, серебром). Для двумерного электрофореза используются различные комбинации. Наиболее распространенной из них является ИЭФ+ДДС-Na-ПААГЭ. Хотя двумерные методы и позволяют наиболее полно выявлять различия, в существующем виде они не пригодны для массового анализа семян в силу своей сложности, длительности и дороговизны.

1.3. Выбор белков для использования в сортовом контроле

Успешное применение электрофоретических методов для идентификации сортов у растений основано на том, что белки являются продуктами структурных генов. Таким образом, белки могут рассматриваться как “маркеры” структурных генов, которые их кодируют. Следовательно, сравнение состава белков от индивидуальных семян различных сортов является сравнением изменений в экспрессии генов. Так как генотипы сортов различаются по аллелям генов, сравнение состава определенных белков позволяет проводить “типизацию” или “паспортизацию” материала. Ясно, что при этом подходе необходимо рассматривать полиморфные белки, т.е. существующие во многих различных молекулярных формах.

При работе с семенами электрофоретическому анализу подвергают белки семян. Наиболее распространенную классификацию белков семян, в том числе и ячменя, основанную на их различной растворимости, предложил Т.Б. Осборн. Согласно этой классификации, выделяют 4 типа белков:

- а) **альбумины**, растворимые в воде, включающие в себя в основном белки-ферменты;
- б) **глобулины**, растворимые в разбавленных растворах солей и присутствующие в мембран-связанных белковых телах, т.е. это запасные белки в строгом смысле этого слова;
- в) **проламины**, растворимые в водно-спиртовых растворах и также являющиеся истинно запасными белками;
- г) **глутелины**, растворимые в кислых или щелочных растворах и являющиеся в основном структурными или запасными белками, хотя некоторые из них могут иметь метаболические функции.

Наиболее пригодными для идентификации сортов являются запасные белки. Почти у всех видов растений запасные белки проявляют значительный полиморфизм в отношении заряда, размеров или обоих параметров. Более того, они кодируются генами в различных локусах, присутствуют в сравнительно больших количествах и легко экстрагируются. Следовательно,

электрофоретическое исследование состава запасных белков семян является эффективным и удобным способом характеристики генотипа растения и может оказаться пригодным для идентификации сортов.

Как было отмечено ранее, у ячменя этим требованиям наиболее полно отвечают спирторастворимые запасные белки эндосперма - проламины (гордеины). Гордеины составляют около 50% суммарного белка зерновки, чрезвычайно полиморфны и обладают сортоспецифичностью. Электрофоретические спектры этих белков не зависят ни от условий выращивания растений, ни от условий и длительности хранения семян. Эти белки появляются в эндосперме на 11-й день после оплодотворения и сохраняются как минимум в течение 3-х суток после прорастания зерновки.

2. Сравнение методов электрофоретического анализа запасных белков.

Опубликовано около 20 методик по идентификации сортов ячменя с помощью электрофореза белков (Cook, 1992). Большинство из них включает разделение гордеинов в кислом pH буфера в полиакриламидном геле. Это в основном разновидности методик электрофореза в крахмальном геле, которые были первыми эффективными методиками фракционирования проламинов и широко использовались в Европе и Австралии.

Прежде, чем рассматривать конкретные методики электрофореза, остановимся на критериях выбора и попытаемся сравнить два используемых метода. Отметим, что хотя стремление некоторых разработчиков методик к их универсальности понятно, однако, как показывает опыт, для различных культур наибольшие различия между сортами достигается при использовании, как различных белков, так и различных модификаций или вообще различных методик электрофореза.

Очевидно, методика должна обеспечивать воспроизводимость результатов анализов, максимальное выявление различий между сортами, быть по возможности быстрой, дешевой, удобной - предусматривать использование минимальное число манипуляций; приборов, таких как центрифуги, криостаты и т.д., а также ядовитых и зловонных реактивов. Важнейшим элементом методики является система регистрации и интерпретации результатов электрофореза. Система регистрации должна быть простой, надежной и объективной.

Как отмечалось выше, часто для электрофоретического разделения белков используют полиакриламидный гель. Однако следует помнить, что акриламид является токсичным веществом. Даже его 1%-ный раствор может вызвать раздражение кожи. Акриламид действует также на центральную нервную систему. Поэтому, работая с акриламидом и гелями на его основе, необходимо соблюдать осторожность и пользоваться резиновыми перчатками. Вместе с тем гели, приготовленные на основе гидролизованного картофельного крахмала, лишены этих недостатков. Некоторые методики предусматривают использование для экстракции гордеинов смесь 2-хлорэтанола и 1% или 2%-ного β -меркаптоэтанола - ядовитого и зловонного препарата, требующего

очень аккуратной работы и герметичности пробирок с пробами. 2-хлорэтанол также является ядовитым веществом (ПДК 0,5мг/м³). С другой стороны, гордеины легко экстрагируются 70%-ным этанолом. Кроме этого, существующие методики электрофореза спирторастворимых белков отличаются по времени электрофореза – от 2 до 5 часов, по величине напряжения электрического тока во время проведения электрофореза: от 350 до 500 вольт; по длительности получения результата – электрофореграмм: от 1 до 4 суток. Как правило, проведение электрофореза в полиакриламидном геле требует охлаждения электродного буфера, что требует использования дополнительного оборудования – криостатов, или сменных охлаждающих элементов. Напротив, электрофорез гордеинов в крахмальном геле не требует дополнительного охлаждения электродного буфера и проводится при комнатной температуре. Очевидно, что перечисленные особенности тех или иных методов электрофореза гордеинов определяют стоимость, время и пригодность методов для проведения массовых анализов при лабораторном сортовом контроле.

2.1. Система интерпретация и регистрации результатов электрофореза.

В интерпретации и регистрации (записи) электрофоретических спектров белков существует принципиально различные подходы.

Один из них основан на определении относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) каждого белкового компонента на электрофоретическом спектре анализируемого сорта относительно или отдельных "маркерных" белковых компонентов (белковых полос на электрофореграмме) какого-либо стандартного сорта (Cook, 1992), или относительно компонентов "эталонного" спектра, полученного при электрофорезе смеси белков сортов различных сортов (Конарев и др., 1979).

Например, ISTA предлагает использовать в качестве стандарта при записи и интерпретации электрофореграмм гордеинов анализируемых сортов спектр гордеина сорта Atem. Этот стандарт должен присутствовать в каждом опыте (в каждой пластине геля при электрофорезе). Затем следует рассчитывать ОЭП "наиболее четких компонентов" анализируемых образцов относительно маркерных компонентов стандарта (рис.1).

Очевидно, что в результирующей формуле электрофореграммы необходимо указывать ОЭП всех регистрируемых компонентов. Это делает формулу громоздкой, т.к. она может включать до 20-ти цифр.

Некоторые исследователи при регистрации электрофореграмм гордеина, получаемых методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, обозначают фенотипические варианты спектров С- и В- гордеинов, контролируемые соответственно локусами *Hor 1* и *Hor 2*, начальными буквами названий сортов (Nielsen and Johansen, 1985; Shewry et al., 1985) или цифрами (Kapala, 1981; Nevo, Beiles and Storch, 1983). При этом у разных авторов одними и теми же цифрами могут быть обозначены различные фенотипические варианты гордеинов. Другие исследователи привязывают получаемые при электрофорезе гордеинов в кислом буфере варианты электрофореграмм, к

соответствующим сортам и затем обозначают эти спектры цифрами (Marchylo and Laberge, 1981).

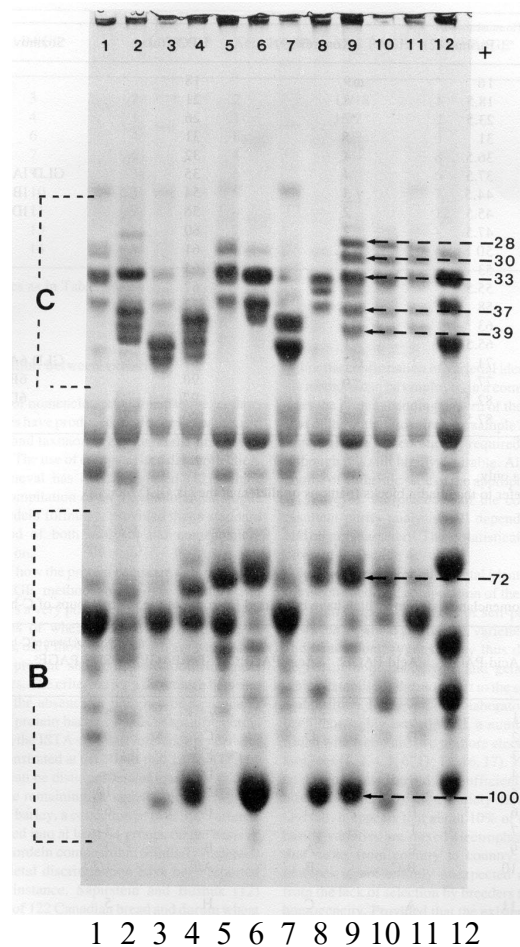


Рис.1. Электрофоретическое разделение гордеинов в кислом ПААГ по методике ISTA; электрофореграммы гордеинов из отдельных зерновок сортов: 1-Torrent, 2- Igri, 3- Marko, 4- Digger, 5- Goldspear, 6- Cameo, 7- Capri, 8 - Клахон, 9- Atem (эталон), 10- Regatta, 11- Maris Otter, 12- Natasha. Цифрами 28 – 100 обозначены маркерные компоненты (Cook, 1992).

Подход, используемый ИОГен РАН, основан на знании наследования и генетического контроля гордеинов и заключается в простом визуальном сравнении типов совместно наследуемых компонентов (блоков компонентов) гордеинов или с изображением (фото) эталонного спектра (спектрами) данного сорта, или с каталогом типов блоков компонентов.

2.2. Генетический контроль электрофоретических компонентов гордеинов

Генетический контроль гордеина наиболее полно изучен при использовании электрофореза в крахмальном геле.

На рисунке 2а представлены электрофореграммы гордеинов двух сортов ячменя Оксамыт (P1) и Завет (P2), а также гибридных зерновок F₁ от реципрокных скрещиваний между ними. На электрофореграммах гордеинов

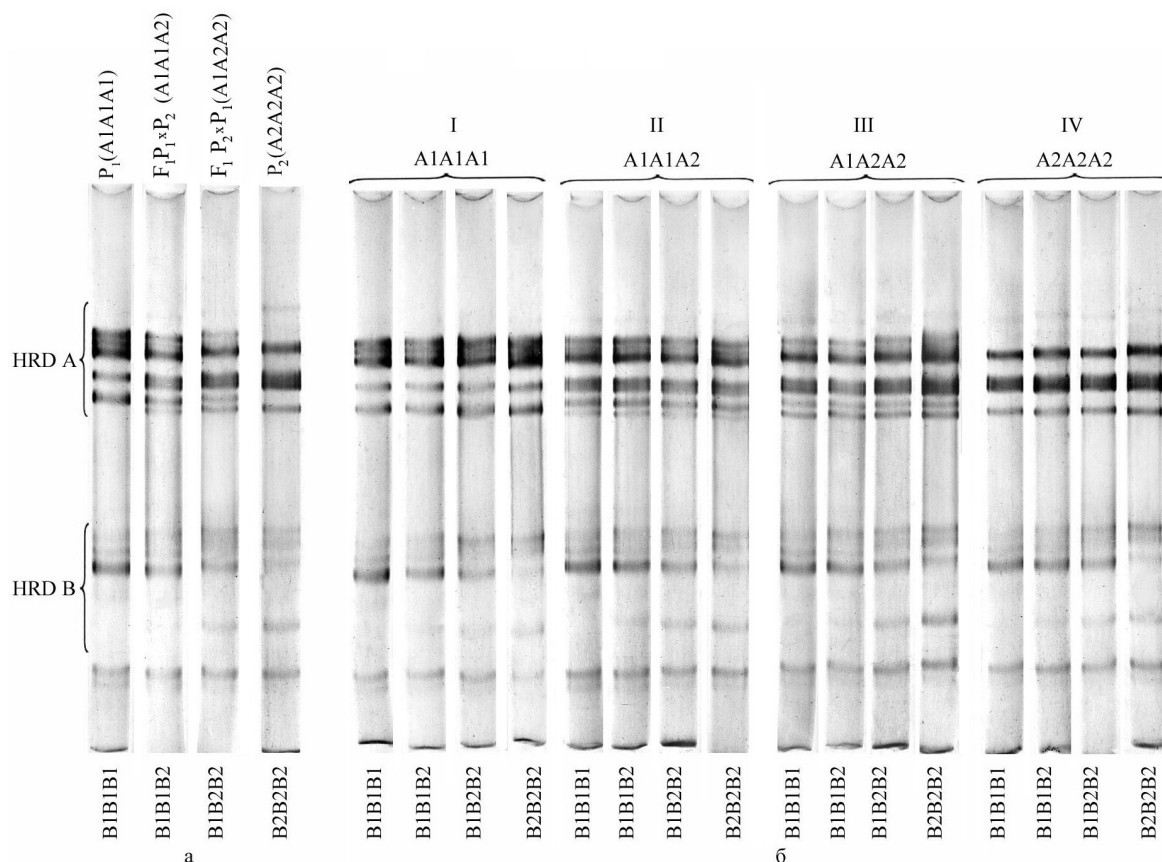


Рис. 2. Наследование электрофоретических компонентов гордеина в F₁ и F₂ в гибридной комбинации Оксамыт х Завет; а – электрофореграммы гордеинов родительских и гибридов F₁ от реципрокных скрещиваний между ними; б – варианты электрофореграмм гордеинов, обнаруженные в F₂.

гибридов F₁ присутствуют все компоненты, имеющиеся на спектрах гордеина обоих родителей. Это свидетельствует о кодоминантном наследовании проламинов. Вместе с тем, электрофореграммы гибридов F₁ от прямого и обратного скрещиваний различаются по относительной интенсивности компонентов. Причем, на спектре гордеина гибрида F₁ от прямого скрещивания более интенсивно проявляются компоненты первого родителя, а на спектре гордеина гибрида F₁ от обратного скрещивания – второго родителя. Это связано с проявлением дозы генов в триплоидном эндосперме (3n), где от материнской формы присутствует двойной набор хромосом – 2n (две дозы генов), а от отцовской – одинарный набор хромосом - n (одна доза генов). Благодаря эффекту дозы генов, можно отличать различные варианты гетерозигот по аллелям одного гена (локуса), а при анализе расщепления в F₂ использовать полную классификацию гибридов, когда фенотипические классы соответствуют генотипическим. Вследствие этого расщепление по аллелям гена (локуса) во втором поколении теоретически должно соответствовать 1:1:1:1.

В результате электрофореза гордеина у 200 отдельных зерен F_2 было обнаружено только 16 вариантов электрофореграмм (рис. 2б). По компонентам гордеина, расположенным в зоне медленной подвижности электрофоретического спектра, которые на рисунке обозначены как гордеины А (HRD A), во втором поколении было обнаружено только четыре класса спектров. Классы I и IV идентичны по гордеинам А, соответственно, сортам Оксамыт (P1) и Завет (P2). Классы II и III идентичны по электрофореграммам этих белков гибридам F_1 , соответственно, от прямого и обратного скрещиваний. Таким образом, компоненты гордеинов А наследуются не по отдельности, а группами. Такая группа совместно наследуемых компонентов была названа **блоком компонентов** (Созинов и др., 1978). Учитывая дозу гена, генотипы эндосперма обнаруженных классов можно представить следующим образом: I – A1A1A1, II – A1A1A2, III – A1A2A2, IV – A2A2A2. Отношение численностей указанных классов соответствует отношению 1:1:1:1 (табл. 1). Это говорит о том, что блок компонентов гордеинов А первого родителя (A1) и блок компонентов А гордеинов второго родителя (A2) контролируются аллелями одного локуса, обозначаемого как *Hrd A*.

Таблица 1

Расщепление по компонентам гордеинов А и В в F_2 от скрещивания
Оксамыт x Завет

Гордеины	A1A1A1	A1A1A2	A1A2A2	A2A2A2	Численность классов по В гордеину	χ^2 для 1:1:1:1	P
A							
B							
B1B1B1	38	2	10	1	51	1,52	>0,50
B1B1B2	1	33	1	8	43		
B1B2B2	8	1	40	2	51		
B2B2B2	1	5	5	44	55		
Численность классов по А гордеину	48	41	56	55	200		
χ^2 для 1:1:1:1	2,95						
P	>0,25						

Аналогичным образом (блоками) наследуются компоненты гордеинов В, расположенные на электрофореграмме в зоне быстрой подвижности. В F_2 по этим белкам также можно выделить только четыре класса, два из которых идентичны родителям, а два – гетерозиготам F_1 от прямого и обратного скрещивания (рис. 2а, б). Расщепление по гордеинам В также соответствует отношению 1:1:1:1 (табл. 1). То есть, блок компонентов В-гордеинов первого родителя (B1) и блок компонентов В-гордеинов второго родителя (B2) контролируются аллелями одного локуса, обозначаемого как *Hrd B*. Как видно из рисунка 2б, у гибридов F_2 варианты гордеинов А и гордеинов В встречаются во всех возможных сочетаниях. В случае независимого наследования локусов *Hrd A* и *Hrd B*, отношение численностей обнаруженных 16-ти генотипов по

этим локусам должно соответствовать отношению (1:1:1:1)(1:1:1:1). Однако, как видно из таблицы 1, реальные численности классов значительно отличаются от ожидаемых при независимом наследовании ($\chi^2=308,74$, $d.f.=15$, $P<0,01$), что свидетельствует о сцеплении локусов *Hrd A* и *Hrd B*. Величина рекомбинации между этими локусами в рассматриваемой комбинации скрещивания составляет $12,31 \pm 1,65\%$.

Таким образом:

- 1) гордеины наследуются по кодоминантному типу;
- 2) менделирующей (наследуемой) единицей являются не индивидуальные компоненты, а группы или блоки компонентов, контролируемые сложными локусами, включающими до несколько десятков генов;
- 3) аллельные варианты блоков компонентов могут различаться по числу, интенсивности и подвижности входящих в них компонентов;
- 4) локусы *Hrd A* и *Hrd B* наследуются сцепленно.

Изучение наследования гордеинов в других гибридных комбинациях позволило установить, что в целом электрофоретические компоненты гордеина контролируются семью сцепленно наследуемыми локусами – *Hrd A*, *Hrd B*, *Hrd C*, *Hrd D*, *Hrd E*, *Hrd F* и *Hrd G*, расположенными на коротком плече хромосомы 5 (1H) ячменя (рис. 3). Среди указанных семи локусов наиболее полиморфными являются три – *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F*.



Рис. 3. Генетический контроль электрофоретических компонентов гордеинов и способ записи электрофореграмм в виде генетических формул гордеинов (Созинов и др., 1978; Netsvetaev, 1982; Поморцев и др., 1983).

3. МЕТОДИКА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ГОРДЕИНОВ ЯЧМЕНЯ В КРАХМАЛЬНОМ ГЕЛЕ

3.1. Оборудование

1. Источник постоянного тока с параметрами на выходе:

- напряжение (V) до 600 вольт,
- сила тока (mA) до 400 миллиампер.

Этим условиям удовлетворяют источники питания: УИП-1; 2301 MACRODRIVE-1, фирма LKB; DESATRONIC 2000/300, фирма Desaga; PowerPack 1000, фирма BIO-RAD и др.

2. Приборы для электрофореза (рис. 4), включающие следующие элементы:

а) верхнюю камеру, изготовленную из органического стекла толщиной 3 мм, представляющую собой куб с ребром 120 мм и пятью гранями. В грань, противоположную отсутствующей грани вклеено кольцо из органического стекла толщиной 4 мм, высотой 20 мм и переменным внутренним диаметром 69 и 71 мм. Меньший диаметр кольца прилегает к грани камеры;

б) нижнюю камеру, представляющую собой обыкновенный химический стакан емкостью 500 мл;

в) коническую пробку из эластичной резины толщиной 10 мм и диаметрами по срезам 68 и 66 мм, имеющую 41 отверстие диаметром 6 мм для трубок, расположенные по спирали. Отверстия для трубок легко делаются с помощью пробочного сверла №1;

г) стеклянные трубки длиной 120 мм, внешним диаметром 7 мм и внутренним диаметром 4 - 5 мм;

д) электроды из нержавеющей стали, в виде стержней толщиной 1- 3 мм и длиной 300 мм (-) и 200 мм (+). Электроды припаяны к обычному двухжильному электрическому проводу с двухполюсной электрической вилкой на конце;

е) три емкости размерами: ширина – 280 мм, длина – 400 мм, высота - 240 мм, для фиксации, окрашивания и отмывки гелей после электрофореза, соответственно. Емкости могут быть изготовлены из нержавеющей стали или из органического стекла толщиной 5 мм;

ж) штативы для фиксирования, окрашивания и отмывки гелей после электрофореза, изготовленные из органического стекла, куда вставлены в два ряда 40 стеклянных трубок диаметром 11 - 12 мм и высотой: 1-й ряд – 160 мм, 2-й ряд – 190 мм (рис. 5);

з) круглодонную колбу емкостью 1 л из термостойкого стекла для заваривания и деаэрации геля и закачивания его в трубки;

и) пробирки емкостью 0,5 мл (стеклянные или пластиковые) для приготовления проб;

к) штативы для пробирок, используемых для приготовления проб;

л) пробирки микробиологические для просматривания гелей и штативы для пробирок.

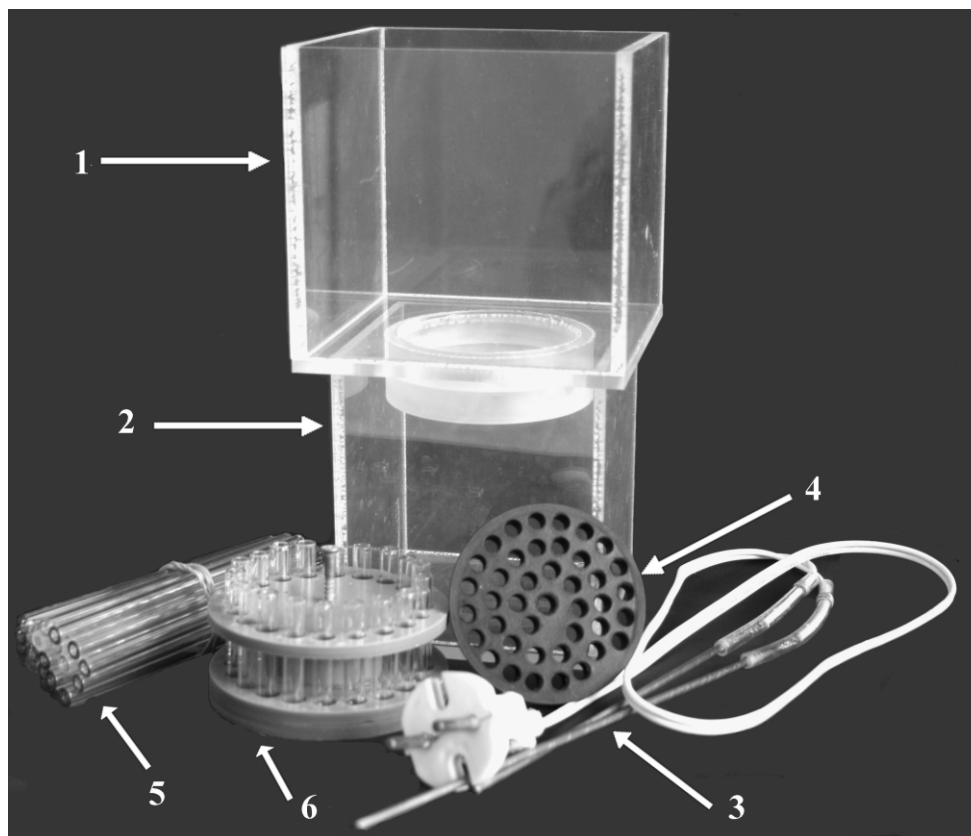


Рис. 4. Элементы прибора для электрофореза гордеинов в крахмальном геле: 1 - верхняя камера; 2 - нижняя камера; 3 - электроды; 4 - резиновая пробка с отверстиями для трубок; 5 - стеклянные трубки; 6 - штатив с пробирками для проб.

3. pH-метр.
4. Магнитная мешалка типа ММ -15
5. Электромеханическая мешалка типа MR-25 (для приготовления больших объемов фиксирующего и окрашивающего растворов).
6. Водоструйный насос или электрический вакуумный насос.
7. Колба Бунзена емкостью 2 - 3 л и воронка Бюхнера.
8. Термостат, способный поддерживать температуру $38 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (типа ТВЗ-25).
9. Сушильный шкаф.
10. Химическая посуда: стаканы, цилиндры, колбы различных объемов.
11. Спиртовка.
12. Световой столик (негатаскоп) со штативом для фотоаппарата для просматривания и фотографирования гелей.
13. Вытяжной шкаф.
14. Холодильник бытовой.
15. Аквадистиллятор.
16. Весы лабораторные, типа ВЛКТ-500.

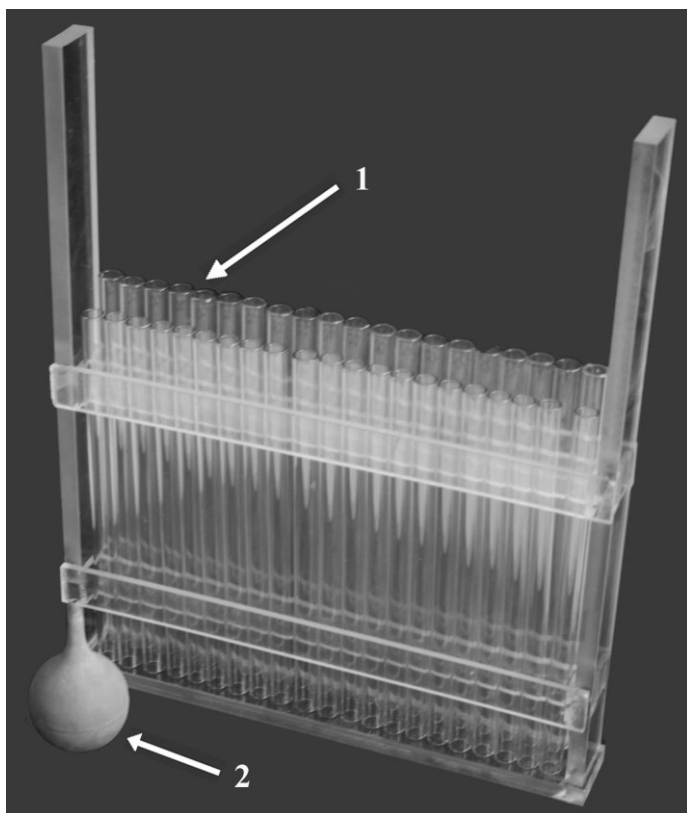


Рис. 5. 1- штатив для фиксирования, окрашивания и отмывки гелей; 2- малая резиновая груша для извлечения гелей из трубок после электрофореза.

3.2. Реактивы

1. Алюминия лактат (молочно-кислый алюминий)
2. Ацетон безводный.
3. Ацетат натрия (уксуснокислый натрий).
4. Гидроокись натрия.
5. Калий двуххромовокислый (бихромат калия).
6. Крахмал картофельный высшей степени очистки.
7. Кислота соляная концентрированная.
8. Кислота серная концентрированная.
9. Кислота молочная (40%-ная отечественная или 92%-ная фирмы Serva).
10. Кислота трихлоруксусная (ТХУ).
11. Мочевина.
12. Нигрозин водорастворимый.
13. Пиронин G.
14. Сахароза.
15. Фенола 1,5%-ный водный раствор.
16. Этанол 96%-ный.
17. Этанол 70%-ный.

Используемые реактивы должны быть категории ОСЧ или ХЧ.

3.3. Отмывка крахмала

Для приготовления крахмального геля используют частично гидролизированный картофельный крахмал. Однако до гидролиза крахмал необходимо отмыть от посторонних примесей (частички земли, песка, прочих посторонних включений).

В начале, 4 – 5 кг картофельного крахмала, предварительно просеянного через сито 0,1 мм, помещают в соответствующую емкость (ванну, таз), заливают 3 – 4 л холодной дистиллированной воды и тщательно размешивают (можно руками) до полного перехода крахмала во взвесь и оставляют примерно на 1 час до момента, когда крахмал образует плотный осадок. Затем самый верхний слой осадка взмучивают (чтобы осевшие на поверхности частицы примесей перешли во взвесь) и воду сливают. Осадок разминают руками до получения возможно меньших комочков, снова заливают дистиллированной водой и размешивают вновь до полного перехода крахмала во взвесь. Разминать осадок без воды следует для того, чтобы образующаяся при последующей заливке водой пена захватывала мелкие частицы примесей (эффект флотации). Отмывку водой повторяют 4 - 5 раз. После последней отмывки крахмал переносят на воронку Бюхнера и подсушивают ацетоном (на 0,5 кг требуется примерно 150 – 200 мл ацетона). Это нужно для того, чтобы на влажном крахмале не поселялись микроорганизмы. Затем подсушенный ацетоном крахмал выкладывают на фильтровальную бумагу и оставляют при комнатной температуре на 2 – 3 суток (до исчезновения запаха ацетона). Высушенный крахмал вновь просеивают через сито 0,1 мм и помещают в плотно закрывающиеся сосуды. Отмывку следует проводить в течение дня во избежание закисания крахмала. В случае необходимости крахмал, залитый водой, можно оставить на ночь в холодильнике при +4⁰С.

3.4. Гидролиз крахмала

Отмытый, высушенный крахмал подвергают частичному кислотному гидролизу. Для этого 400г крахмала помещают в емкость с притертым горлом (или плотно закрывающейся крышкой), которую помещают в термостат при температуре 38,5⁰С и оставляют на ночь. **Емкость не закрывать!** В этот же термостат и на это же время помещают плотно закрытую емкость с 1 л безводного ацетона. Это делается для того, чтобы крахмал и ацетон нагрелись до требуемой температуры. Перед гидролизом в ацетон добавляют 12 мл концентрированной соляной кислоты и ставят еще на 1 час в термостат. Затем смесь ацетона и соляной кислоты под вытяжным шкафом быстро выливают в емкость с крахмалом, плотно закрывают ее пробкой, быстро перемешивают до полного перехода крахмала во взвесь и вновь ставят в термостат при температуре 38,5⁰С (**в закрытом виде!**). В зависимости от партии крахмала время гидролиза, после которого получается крахмал для приготовления гелей требуемого качества, может колебаться от 19 до 50 мин. Это время подбирается опытным путем на небольших (50 – 100 г) навесках крахмала. По истечении времени гидролиз останавливают раствором уксуснокислого натрия (28 г CH₃COONa на 500 мл дистиллированной воды), выливая раствор в смесь ацетона, соляной кислоты и крахмала. Содержимое сосуда тщательно перемешивают и затем переносят на предварительно помещенный бумажный фильтр в воронку Бюхнера и промывают крахмал дистиллированной водой для удаления образовавшейся соли (NaCl) и уксусной кислоты (не менее 1,5 л на 400 г крахмала). После отмывки водой, крахмал подсушивают ацетоном (как при отмывке крахмала) и выкладывают на фильтровальную бумагу для сушки.

После высушивания крахмал просеивают через сито 0,1 мм и перекладывают в плотно закрывающиеся емкости.

Оптимальным считается гидролиз, позволяющий получать 12 - 14%-ные гели с хорошими механическими свойствами (эластичные, способные стоять вертикально и не складываться в пробирках с водой). Но для работы вполне пригодны гели с концентрацией крахмала от 11 до 16% (если они имеют соответствующие механические свойства). В отличие от ПААГ, изменения в концентрации крахмального геля не влияют на получаемые электрофореграммы.

3.5. Приготовление фиксирующего и красящего растворов для визуализации белков в геле

Для приготовления фиксирующего раствора 1000 гр. ТХУ (трихлоруксусной кислоты) растворяют в 19 л дистиллированной воды. Следует помнить, что ТХУ является сильным ядом и при работе с ней необходимо соблюдать **осторожность!**

Для приготовления окрашивающего раствора 400 гр. водорастворимого нигрозина растворяют в 20 л дистиллированной воды. Порошок красителя постепенно добавляют в воду при постоянном перемешивании с помощью электро-механической мешалки. Раствор перемешивают в течение 1,5 - 2 часов до полного растворения нигрозина.

Растворы переливают в специальные емкости (см. 3.1.е). Растворы ТХУ и нигрозина в зависимости от интенсивности работы могут использоваться от 6 до 10 месяцев. Емкости с растворами устанавливают в вытяжном шкафу и накрывают крышками.

3.6. Приготовление буфера

Для электрофореза в крахмальном геле используется алюминий-лактатный буфер. На 1 л буфера берут 1,5 г лактата алюминия (молочно-кислого алюминия) и доводят значение рН молочной кислотой до 3,1.

3.7. Приготовление крахмального геля

Крахмальный гель готовят на буфере с добавлением мочевины до 3-х молей. Расчетное количество гидролизованного крахмала, мочевины и буфера (табл. 2) помещают в круглодонную колбу емкостью 1 л. Колбу с содержимым нагревают на пламени спиртовки при постоянном и энергичном помешивании. По мере нагревания, находящаяся в колбе смесь становится вначале вязкой, а затем разжижается и становится прозрачной. Заваривать гель следует до начала закипания. После заваривания гель в колбе деаэрируют при помощи электрического или водоструйного вакуумного насоса. Отметим, что деаэрацию при использовании водоструйного насоса, можно проводить непосредственно в колбе для заваривания геля. При использовании масляных вакуумных насосов с высоким разряжением, колбу с заваренным гелем обязательно следует помещать для деаэрации в вакуумный эксикатор во избежание разрушения колбы при резком разряжении воздуха! После деаэрации гель заливают в трубки.

Таблица 2.

Соотношение компонентов для приготовления крахмального геля

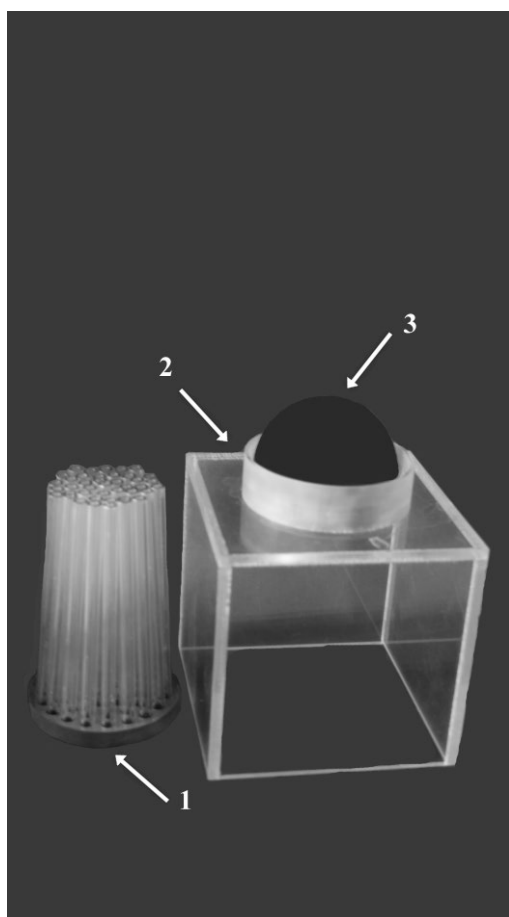
% геля	16%		15%		14%		13%		12%		11%	
Крах-мал, г	Б* мл	М* г	Б мл	М г	Б мл	М г	Б мл	М г	Б мл	М г	Б мл	М г
14	87	15,6	93	16,8	100	18,0	108	19,5	117	21,0	127	22,8
13	81	14,6	87	15,7	93	16,8	100	18,0	108	19,5	118	21,2
12	75	13,3	80	14,4	86	15,5	92	16,5	100	18,0	109	19,6
11	69	12,4	73	12,2	79	14,1	85	15,3	92	16,5	100	18,0
10	63	11,2	67	12,0	71	12,8	77	13,8	83	15,0	91	16,4

Примечание: Б* - количество буфера, М* - количество мочевины.

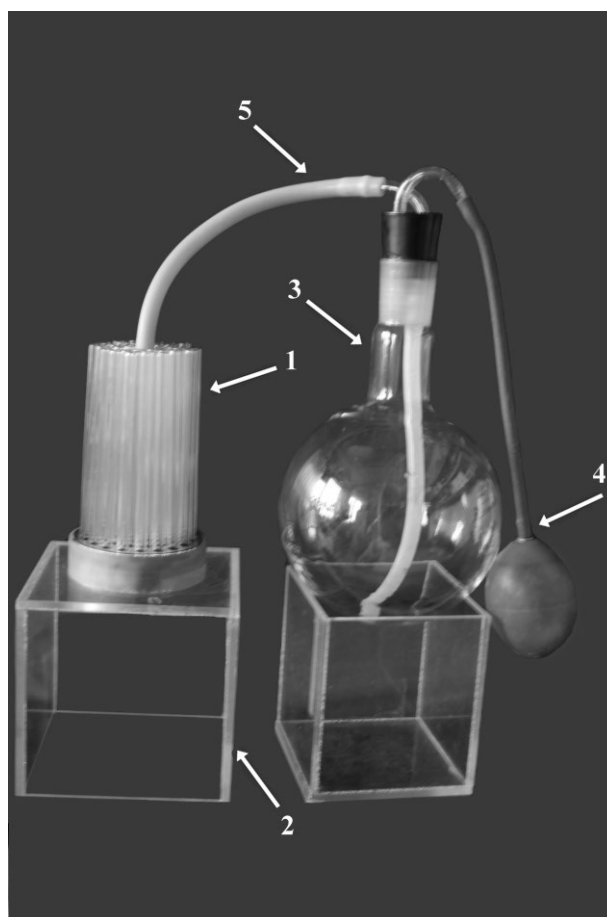
Для формирования одинаковых столбиков геля, стеклянные трубки вставляются в резиновую пробку толщиной 1см с отверстиями (обычно отверстий 41 или 61, расположенных по спирали) таким образом, чтобы они не выходили за обрез пробки (рис. 6а, 1). В кольцо электрофоретической камеры вставляют резиновую пробку без отверстий (рис. 6а, 2, 3), и затем в кольцо электрофоретической камеры вставляют пробку с трубками таким образом, чтобы между обрезом пробки с трубками и пробкой без отверстий оставалось свободное пространство 2 - 3 мм (рис. 6б, 1, 2). После этого в центральную трубку с помощью груши с клапаном закачивают из круглодонной колбы заваренный деаэрированный гель (рис. 6б, 3, 4, 5). Все трубки при этом заполняются одновременно и до одного уровня по закону сообщающихся сосудов. Когда верхняя граница геля окажется примерно в 1см от верхнего края трубок, заливку прекращают. Трубки с залитым гелем помещают в насыщенный водными парами эксикатор (или накрывают смоченным водой химическим стаканом) на ночь или на 1,5 - 2 часа в холодильник при +4°C. После того, как гель застыл, можно на него наносить экстракты белков и ставить электрофорез.

3.8. Приготовление экстрактов белков

Обычно для приготовления экстрактов зерно растирают в ступке, заливают экстрагирующим раствором, центрифугируют. Для электрофореза используют третий экстракт. Удобнее использовать один из двух способов, не требующих растирания сухого зерна в ступке и центрифугирования. При этом для электрофореза можно использовать первый спиртовой экстракт гордеинов.



а



б

Рис. 6. а: 1 – пробка с трубками, 2 – верхняя электрофоретическая камера, 3 – пробка без отверстий; б: 1 – пробка с трубками, вставленная в кольцо верхней электрофоретической камеры, 2 – верхняя электрофоретическая камера, 3 – колба емкостью 1л для заваривания и деаэрации геля, 4 – груша с клапаном, 5 – силиконовый шланг.

1. Зерно помещают в емкость (колбы или банки), заливают до полного погружения 1,5%-ным водным раствором фенола, плотно закрывают и ставят на ночь в термостат при температуре 38,5°C. После такой обработки зерновка становится мягкой и легко освобождается от пленок с помощью пинцета. Очищенную зерновку помещают в стеклянные пробирки емкостью 0,5мл, заливают 150 – 200 микролитрами 70%-ного этилового спирта и растирают его стальной палочкой или с использованием электромеханического привода для гомогенизации, Sigma (рис. 7). В конечном итоге соотношение осадок/спирт должно быть примерно 1:1.

2. При наличии лабораторной крупорушки (рис. 8), сухое зерно вначале очищают от пленок, затем помещают в емкости с 1,5%-ным раствором фенола на ночь, как и при первом способе, затем споласкивают несколько раз дистиллированной водой, раскладывают по 0,5 мл пробиркам, заливают спиртом и растирают.



а



б

Рис. 7. Электромеханический привод для гомогенизации (а); гомогенизация зерна в растворе спирта с помощью электромеханического привода (б).

После этого пробирки с пробами помещают в эксикатор с насыщенными парами спирта на ночь или на 1,5 - 2 часа в термостат при $38,5^{\circ}\text{C}$ до полного осветления экстракта в пробирках.



Рис. 8. Лабораторная крупорушка (burrows electric barley pearler. Seedburo Equipment Company). Минимальная навеска 50 г зерна.

3.9. Нанесение проб (экстрактов белков) на гель

Трубки с гелем вставляют в отверстия пробки, располагая их на нескольких уровнях для удобства нанесения экстракта. В свободное пространство трубок с гелем наносят 80 - 100 микролитров экстракта. Перед

нанесением экстракта в 1 - 2 трубки помещают по 1-й капле раствора пиронина G (в 20%-ном растворе сахарозы растворяют несколько кристалликов красителя до появления ярко- красной окраски). Пиронин движется ровно в 2 раза быстрее самых быстроподвижных компонентов гордеина и используется как метка для определения окончания электрофореза, поскольку время электрофореза сильно зависит от температуры окружающей среды и электродного буфера. Нанесенные на гели экстракты присыпаются сухим гидролизованным крахмалом - антиконвекционная среда. Можно использовать и крахмал после пробных или неудачных гидролизом. Крахмал присыпают постепенно и таким образом, чтобы не оставалось свободного экстракта, пузырьков воздуха в столбиках присыпанного крахмала, а поверхность крахмала была влажной. Вместо крахмала в качестве антиконвекционной среды можно использовать обычный песок, предварительно хорошо промытый водой, высушенный и просеянный через сито 0,1 мм.

3.10. Электрофорез

После нанесения проб пробку с трубками помещают в верхнюю камеру для электрофореза. В камеры наливают буфер, вставляют электроды (верхняя камера "+", нижняя камера "-") из нержавеющей стали и подключают к источнику постоянного тока (рис. 9). Стабилизация идет по напряжению. Первые 15 – 20 минут (в зависимости от температуры буфера) электрофорез идет при напряжении 300 V. Когда белки войдут в гель (при этом пиронин входит в гель на 5 – 7 мм), прибор отключают от источника питания, из верхней камеры буфер выливают в стакан и несильной струей воды (чтобы не разрушить старты гелей) вымывают из трубок крахмал (или песок), использовавшийся в качестве антиконвекционной среды. После смывания крахмала из свободного пространства трубок удаляют воду встряхиванием. Затем пробку с трубками вновь помещают в верхнюю электрофоретическую камеру, заливают буфер, вставляют электроды и электрофорез продолжают при 350 V. При этом нужно следить, чтобы в свободном от геля пространстве трубок не оставались воздушные пробки. Смывание крахмала значительно снижает электрическое сопротивление гелей и сокращает время электрофореза.

Когда первая метка пиронина подойдет к нижнему обрезу трубок с гелем, в эти же трубки вновь помещают по одной капле красителя. Когда вторая метка вновь подойдет к нижнему обрезу трубок - электрофорез прекращают. Длительность электрофореза, в зависимости от температуры, может колебаться от 1ч. 45 мин. до 2ч. 15 мин. После окончания электрофореза гели с помощью малой резиновой груши выдавливают из трубок в специальный штатив (рис. 4), предварительно помещенный в емкость с 5%-ным раствором ТХУ и фиксируют в течение 10 минут. Затем штатив с гелями переносят в емкость с 2%-ным раствором водорастворимого нигрозина и окрашивают в течение 10 - 15 минут. После окрашивания штатив с гелями переносят в третью емкость с проточной,

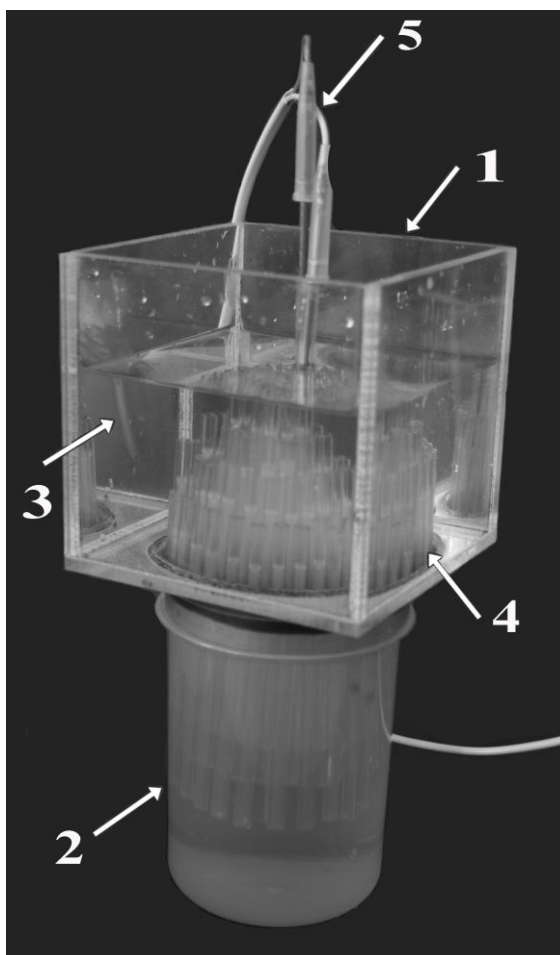


Рис. 9. Прибор для электрофореза гордеинов в крахмальном геле в собранном виде: 1 - верхняя камера; 2 - нижняя камера с буфером; 3 – буфер; 4 – трубки с гелем; 5 – электроды.

теплой водопроводной водой и отмывают гели в течение 2 - 3 часов до момента, когда гели будут иметь светло-голубую окраску, а компоненты гордеинов интенсивную синюю окраску и будут четко видны.

Просматривают и фотографируют гели в проходящем свете на пленку микрат-300 (или микрат-500) или цифровым фотоаппаратом. В качестве светового столика для просмотра и фотографирования гелей можно использовать негатоскоп для просмотра рентгеновских снимков.

Крахмальные гели при необходимости можно законсервировать и хранить в течение нескольких лет. Для этого гели помещают в пробирки с насыщенным раствором NaCl и плотно закрывают.

3.11. Регистрация и интерпретация электрофореграмм гордеинов

Одним из важных элементов методики электрофоретического анализа гордеинов является способ интерпретации и регистрации электрофоретических спектров. Как отмечалось выше (2.2), в изложенной методике регистрация электрофореграмм основывается на генетическом контроле гордеинов. Компоненты гордеина наследуются группами (блоками) и контролируются несколькими кластерами тесно сцепленных и не рекомбинирующих между собой генов (локусами). Таким образом, блок компонентов является

менделирующей единицей (его наследование подчиняется законам Менделя при моногенном наследовании). Всего известно 7 локусов, обозначаемых как *Hrd A* - *Hrd G*. Три из этих локусов (*Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F*) очень полиморфны. Для гордеинов, контролируемых этими тремя локусами к настоящему времени известно около 400 вариантов блоков компонентов. Аллельные блоки компонентов гордеинов различаются по числу, подвижности и интенсивности компонентов. Каждому варианту блока присвоен свой номер в порядке обнаружения. Остальные четыре локуса (*Hrd C*, *Hrd D*, *Hrd E* и *Hrd G*) контролируют присутствие или отсутствие отдельных компонентов. Блоки компонентов, контролируемые локусами *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F* на электрофоретическом спектре разделены пространственно (рис. 2). Это позволяет создавать каталоги аллельных вариантов блоков компонентов, контролируемых различными локусами. На рисунках 10 и 11 представлены каталоги гордеина А, а также гордеинов В и F соответственно, выявленные в результате анализа более 1600 сортов ярового ячменя из 25 стран мира.

Сравнивая электрофоретические спектры гордеинов анализируемых сортов с блоками компонентов, имеющихся в каталогах, можно легко записывать электрофореграммы в виде генетических формул. На рисунке 12 представлены электрофореграммы гордеинов сорта Абава. При сравнении электрофоретических спектров гордеинов сорта Абава с каталогами блоков компонентов (рис. 10, 11) видно, что по гордеинам А у этого сорта присутствует блок HRD A2, по гордеинам В – блок HRD B8 и по гордеинам F - блок HRD F2. Таким образом, электрофоретический спектр гордеина сорта Абава можно записать в виде генетической формулы: HRD A2 B8 F2 (или 2.8.2).

Возможно и обратное действие, когда, имея формулу гордеинов сорта и каталог аллельных вариантов, можно легко представить электрофоретический спектр гордеинов интересующего нас сорта.

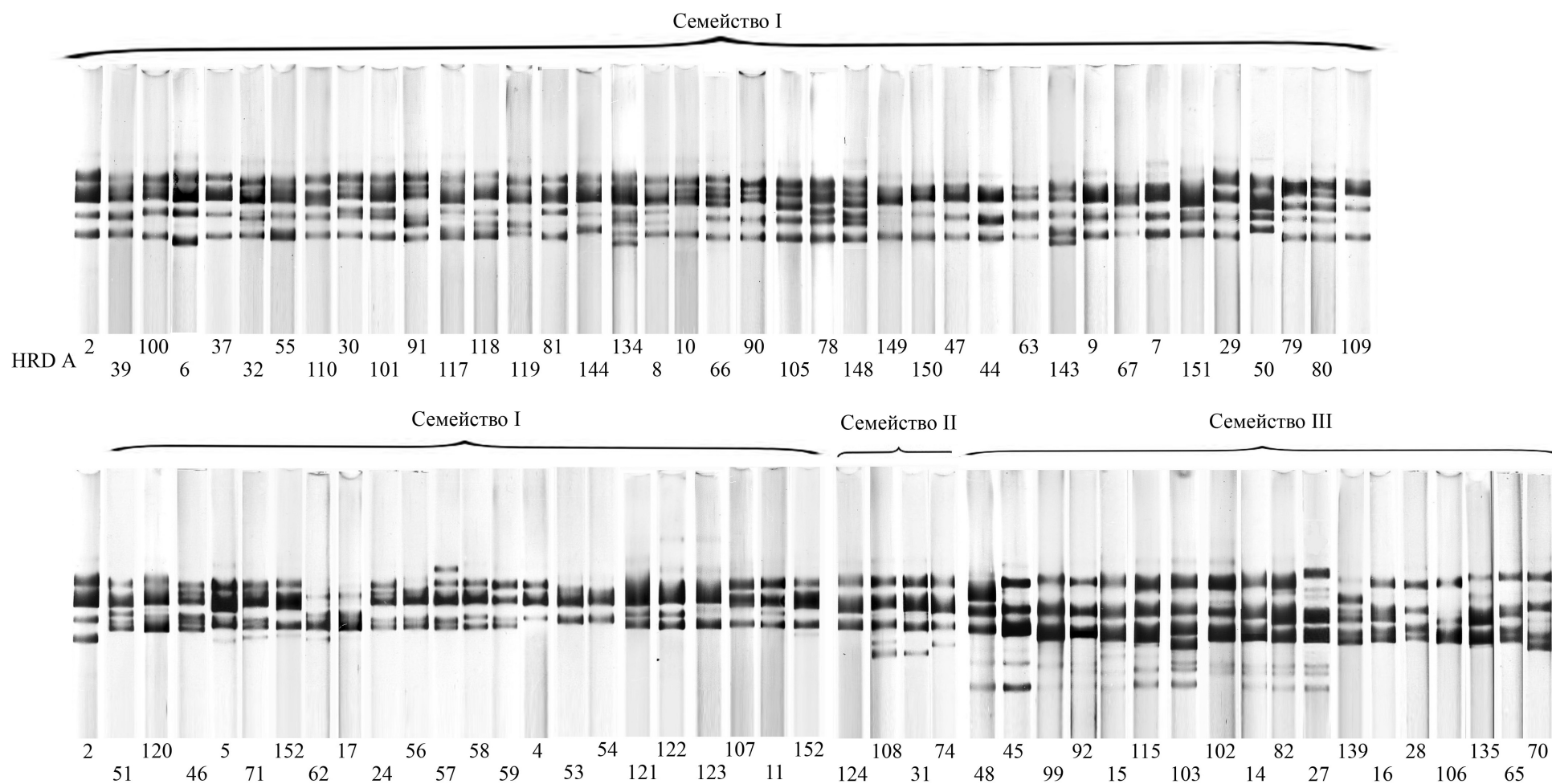


Рис. 10. Варианты блоков компонентов гордеина А, выявленные при анализе более 1600 сортов ячменя.

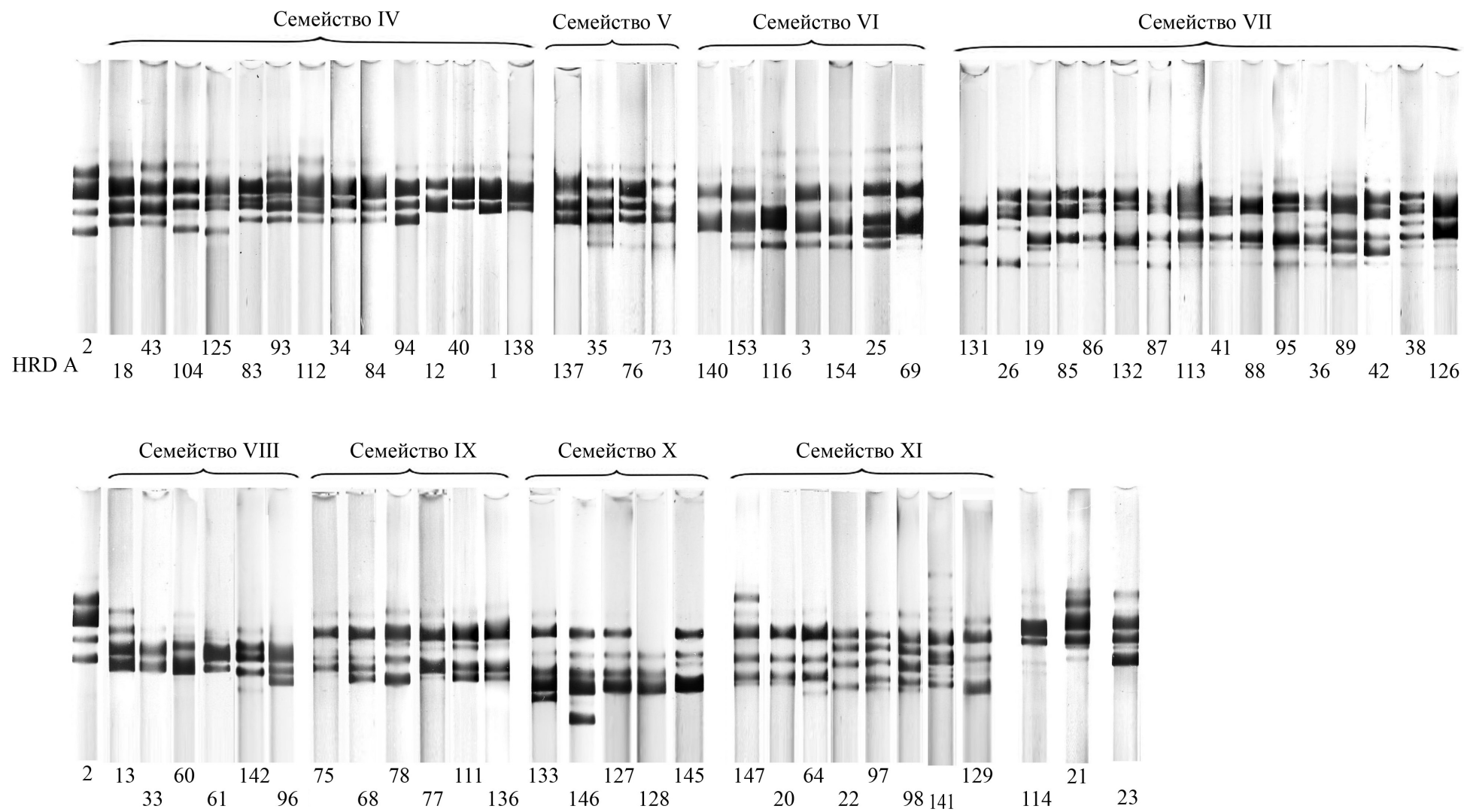


Рис. 10. Окончание.

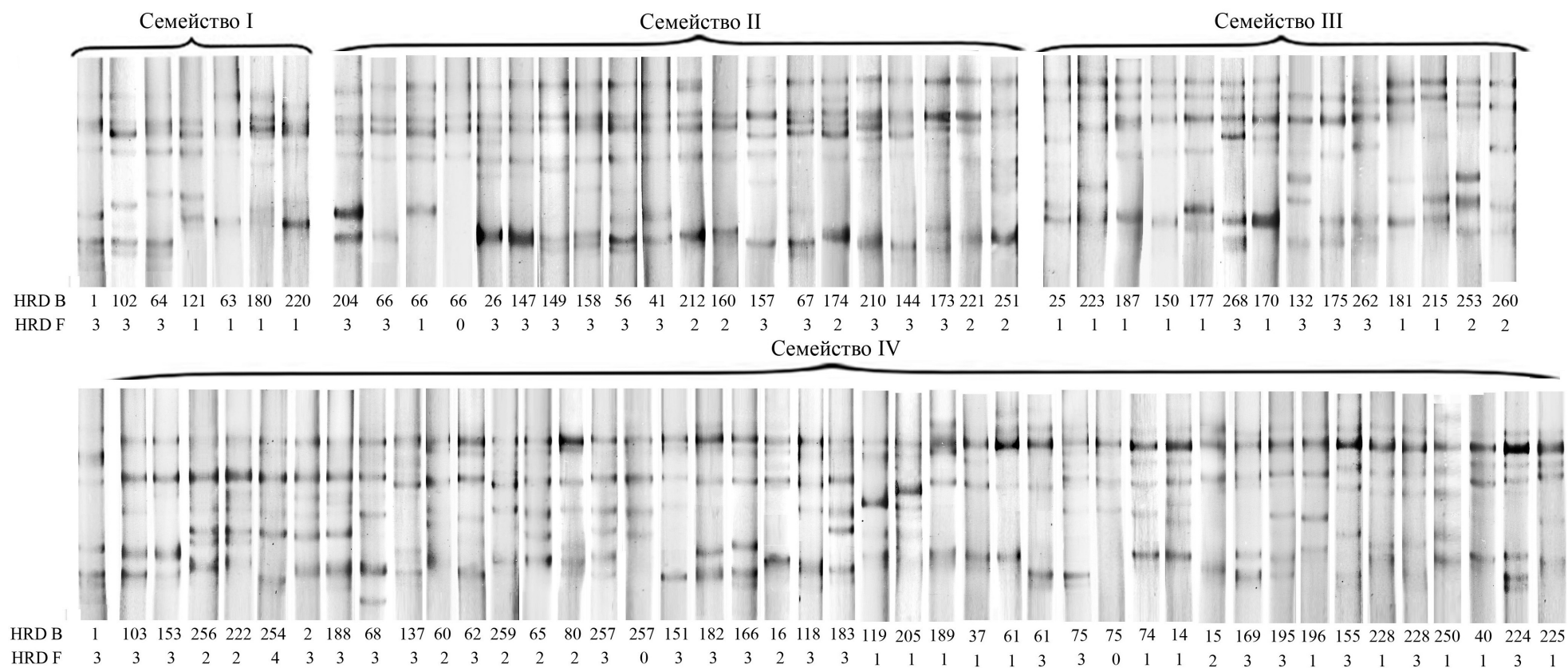
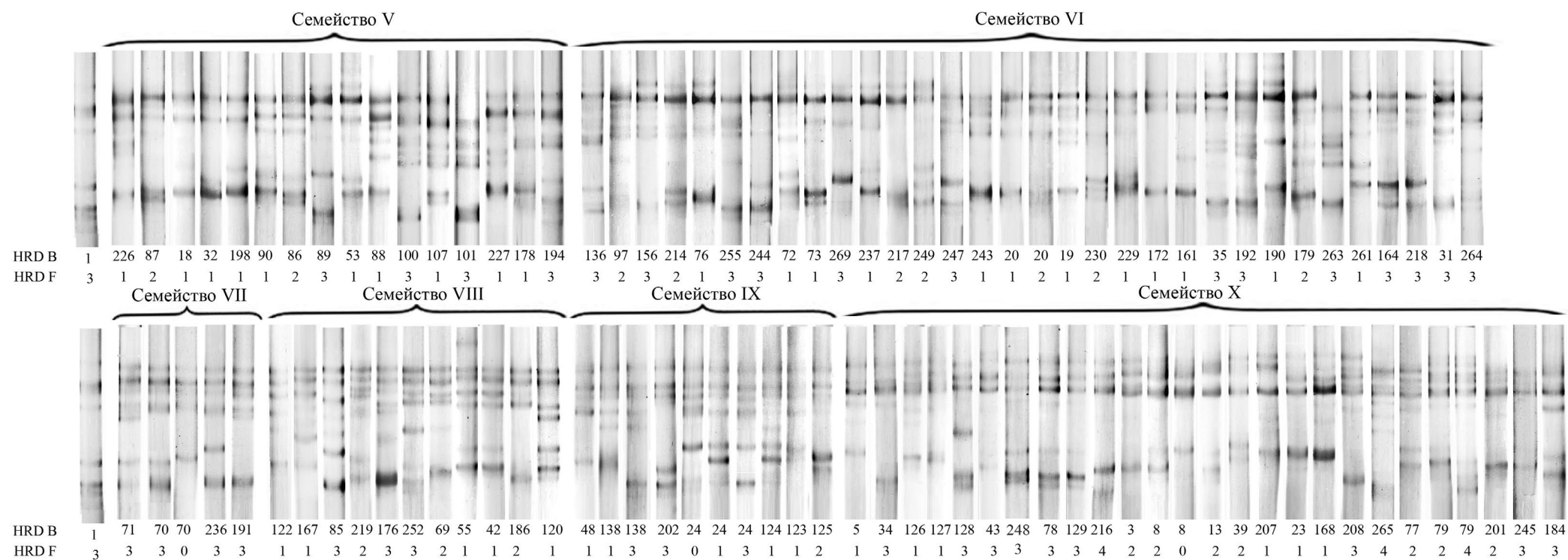
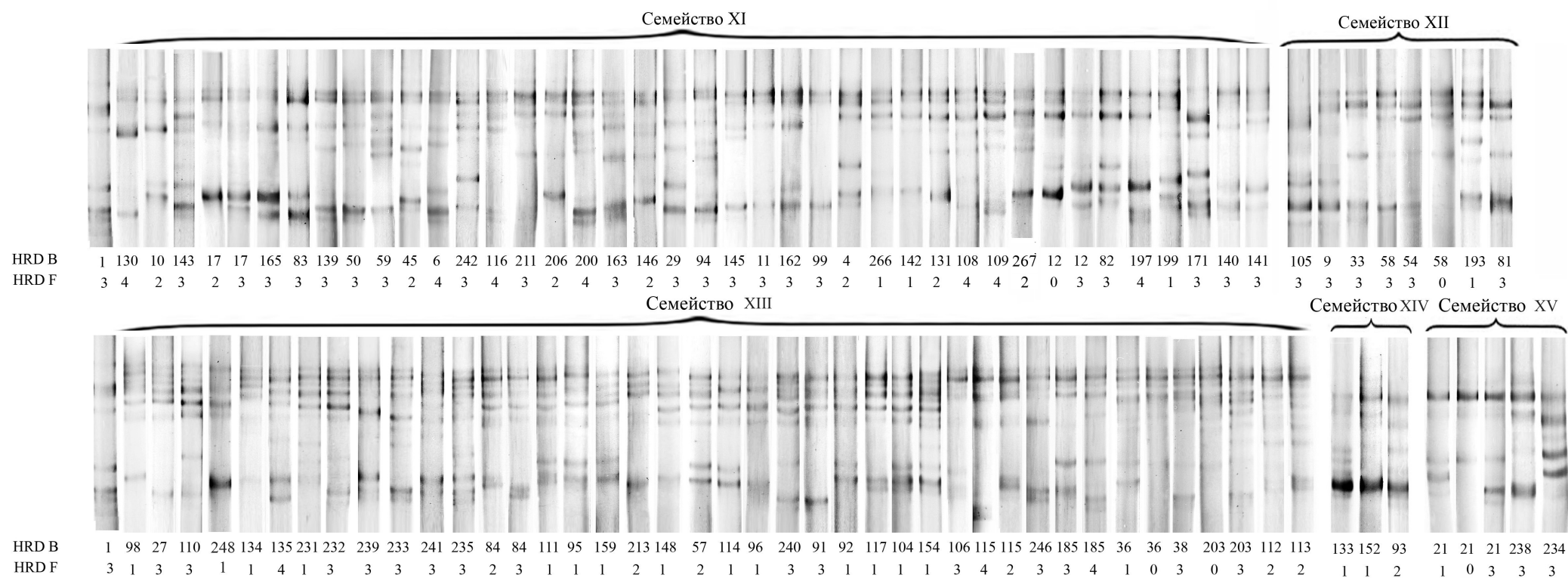


Рис. 11. Варианты гордеина В, выявленные при анализе более 1600 сортов ячменя.



Продолжение рис. 11.



Окончание рис. 11.

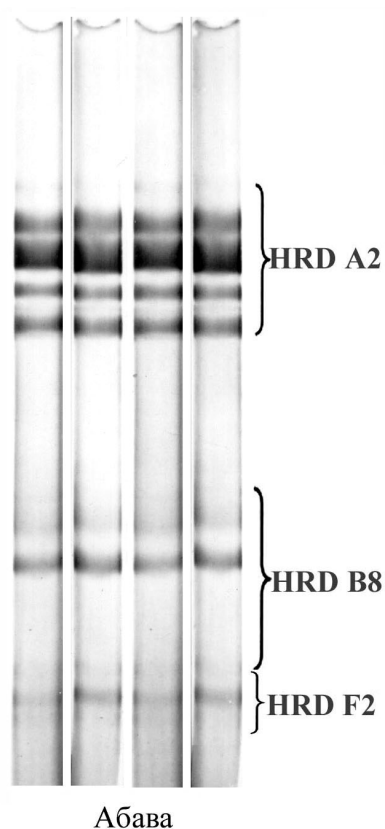


Рис. 12. Варианты блоков компонентов, контролируемых аллелями локусов *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F*, присутствующие на электрофореграмме гордеинов сорта Абава.

С использованием имеющихся каталогов блоков компонентов, контролируемых локусами *Hrd A* – *Hrd G*, были определены генетические формулы гордеинов большинства сортов ячменя, допущенных к использованию на территории России и перспективных для включения в реестр (табл. 3). Электрофореграммы этих сортов приведены в приложении. Для определения генетических формул гордеинов использовали эталонные образцы семян сортов ячменя, полученные из Государственной комиссии Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений.

Таблица 3
Генетические формулы гордеина сортов ярового ячменя, перспективных и допущенных к использованию на территории РФ.

№	Сорт	A	B	F	Регион
1	Абава	2	8	2	2,4
2	Андрей	2	95	1	10, 11
3	Анна	2+28	19+63	1+3	9, 11
4	Аннабель	2	17	3	2,3,5,7,10
5	Арбалет	23	6	2	
6	Астория	2	8	2	6
7	Атаман	23	8	2	3, 5
8	Ауксиняй 3	2	25	1	5

Продолжение табл. 3

9	Ача	12	1	3	4,10,11,12
10	Баган	12	8	2	10
11	Барке	2	19	1	
12	Бахус	2	25	1	11
13	Беатрис	23	8	2	3, 5
14	Безенчукский 2	2+12	19+21	1+3	7
15	Белгородец	32	21	0	5
16	Белогорский	2	39+84	2+3	2
17	Беркут	28	19	3	7
18	Бином	2+23	8	2	4
19	БИОМ	24	8	2	10, 11
20	БИОС-1	2	8	2	2,3,4,7
21	Вакула	23	1	3	5, 6
22	Варде	40	8	2	1
23	Велес	2	8	2	3,4,5,7
24	Вереск	12	8	2	4
25	Визит	18	67	1	3,5
26	Виконт	12	17+93	2+3	6
27	Витим	2	8	2	11
28	Владимир	21	25	1	3,5
29	Волгарь	24+28	8	2	7
30	Вулкан	18	67	1	4,11,12
31	Выбор	2	19	1	2
32	Вымпел	24	8	2	7
33	Гелиос УА	23	1	3	5
34	Гетьман	2+32	21+35	0+1	5, 6
35	Гонар	2	19	3	2,3,4,5
36	Горинский	2	35	1	5,12
37	Данута	2	17	3	3
38	Дворан	12	19	1	5
39	Джейби Флэйва	155	270	3	2, 3
40	Джин	2	8	2	3,4
41	Дина	2	95	1	1,2,3,4,5,7
42	Донецкий 8	28	19	3	8,9
43	Ергенинский 2	28	19	3	8
44	Ерофей	2	84	3	12
45	Жозефин	2	19	1	3,5
46	Задел	28	84	2	10
47	Задонский 8	2	17	3	6
48	Зазерский 85	2+12	19+53	1	2,3,4,5,7
49	Зевс	2	17	3	2,3,4,5,10
50	Зерноградец 770	23	29	3	5,6,8
51	Зерноградский 244	2+28	19+35	1+3	8

Продолжение табл. 3

52	Зерноградский 584	23	29	3	6,8,9
53	Зерноградский 813	23	29	3	6
54	Золотник	2	1+8	2+3	10
55	Каскад	2+12	19+53	1	6
56	Казак	28	8	2	7
57	Камышинский 23	2+28	19+21	1+3	5,6,8
58	Кедр	2	1+13	2+3	10,11
59	Княжич	2	17	3	5
60	Колчан	13	1	3	10
61	Красноуфимский 95	2+12	8+19	1+2	9
62	Красноярский 80	2	17	3	11
63	Криничный	21	8	2	2,3
64	Ксанаду	2	5	1	3,5
65	Лель	2	53+271	1	4
66	Ленинградский	2	17+209	2	2
67	Лунь	2	1	3	7
68	Мамлюк	12	21	1	6
69	Маныч 459	2	17	3	6
70	Маргрет	21	8	2	3,5
71	Мареси	23	8	2	2
72	Марни	4	164	3	5
73	Медикум 85	20	37	1	9
74	Медикум 135	20	37	1	8
75	Мессина	2	8	2	3
76	МИК-1	21	25	1	5
77	Михайловский	2	8	2	2,3,4,9
78	Московский 2	2	19	1	3,4
79	Московский 3	2+21	19+25	1	2,3
80	Муссон	2	19	1	12
81	Наран	2+23	19	1	11
82	Неван	2	13	2	1,4,11
83	Никита	2	17	3	10
84	Новичок	2	17	3	4
85	Новосибирский 80	2+24	8	2	10,11
86	Нур	2	25	1	1,2,3,4,7
87	Нутанс 278	28	19+37	1+3	8
88	Нутанс553	28	19	3	5,7,8,9
89	Нутанс642	28	19	3	7,8
90	Одесский 100	2+12	8	2	5,6,7,9,10,11,12
91	Одесский 115	12	8	2	5,8,10,11
92	Одесский 22	2	8	2	6
93	Омский 87	2	17	3	10
94	Омский 88	2	17	3	10

Продолжение табл. 3

95	Омский 89	12	84	3	10
96	Омский 90	2+4	17+19	1+3	9,10
97	Омский 91	2+12	1+8	2+3	10
98	Омский 95	28	1+8	2+3	9,10
99	Омский голозерный 1	2+18	1+17+35	1+3	9,10
100	Омский голозерный 2	2	8	2	10
101	Оренбургский 11	13+20	35+37	1	9
102	Оренбургский 15	28	19	3	9
103	Оренбургский 16	20+28	19+37	1+3	9
104	Оренбургский 17	13	84	3	9
105	Оренбургский кормов.	28	19	3	9
106	Оскар	12	1	3	11
107	Отра	12	8	2	2
108	Пасадена	23	8	2	5
109	Пастбищный	24	101	3	9
110	Пауэр	2	29	3	
111	Первенец	2+13	35+45	1+3	12
112	Пивденный	2	1	3	6,8
113	Посада	32	29	3	3, 5
114	Прерия	2	17	3	6,7,8,9,10,11
115	Престиж	2	6	2	
116	Приазовский 9	14	8	2	3,5,6,7,10,12
117	Прикумский 22	2	2	3	6
118	Прикумский 47	2	1+2	3	6
119	Прикумский юбил.	2	2	3	6,8
120	Прима Белоруссии	18	67	1	3
121	Приморский 44	2	17	3	12
122	Приморский 89	1+2	8+19	1+2	12
123	Приморский 98	28	19	3	12
124	Ратник	2	156	1	6,8
125	Раушан	21	25	1	1,3,4,7
126	Рахат	18	19	1	3,4,7
127	Роланд	2	8	2	4
128	Рубикон	2	17	3	6
129	Сигнал	2	8	2	10,11
130	Симон	12	1	3	10
131	Скарлетт	2	5	1	3,5
132	Соболек	12	13	2	11
133	Сокол	2	1	3	6
134	Сонет	2	8	2	2,3,4
135	Субмедикум 33	2	17	3	8
136	Суздадец	2+21	25	1	2,3,5
137	Таловский 9	2+28	19+17	1+3	5

Окончание табл. 3

138	Тамми	12	8	2	11
139	ТАН-1	23	29	3	6,11
140	Тандем	47	18	1	4
141	Тимерхан	18	19	1 G	7
142	Толар	2	19	1	3,6
143	Торос	2	17	3	4
144	Урса	23	19	1	3,5
145	Филадельфия	23	29	3	2,5
146	Хаджибей	2	21	1	5
147	Харьковский 74	1	19	1	2
148	Харьковский 99	28	19	3	7,8,9,10
149	Чакинский 221	2	17	3	5
150	Челябинец 1	2	8	2	9
151	Челябинский 96	12+18	1	3	9
152	Эколог	2	8	2	4,11
153	Эльф	2+32	45	2+3	2,3,4,5,7,10
154	Як 401	8+28	19	3	7,8
155	Ясный	12	17	3	5, 12
156	Ястреб	2	1	3	7

Как видно из таблицы 3, 77% сортов ячменя характеризуются электрофоретическими спектрами гордеинов, включающих по одному варианту блока компонентов, контролируемого каждым из локусов *Hrd*. Такие сорта имеют только один тип электрофореграмм и являются линейными по гордеин-кодирующим локусам (**мономорфными** по гордеинам сортами). Однако значительная доля сотов характеризуются двумя и более электрофоретическими спектрами гордеинов, отличающимися по вариантам блоков компонентов, контролируемым, соответственно, одним или более локусами. Такие сорта называются **гетерогенными** по гордеин-кодирующим локусам, а при написании их генетических формул гордеина варианты блоков компонентов, контролируемых аллелями одного локуса (или аллели), разделяются знаком «+». Гетерогенность сорта обусловлена отбором его родоначального растения, которое могло оказаться гетерозиготным по одному, двум или более гордеин-кодирующим локусам. От того, по скольким локусам родоначальное растение было гетерозиготным, зависит число биотипов. Если родоначальное растение сорта было гетерозиготным по одному, двум или трем локусам, то в результате дальнейшего расщепления и рекомбинации между гордеин-кодирующими локусами в сорте будут обнаруживаться только два, четыре или восемь биотипов соответственно, различающихся по вариантам блоков компонентов, контролируемым разными аллелями одного, двух или трех локусов.

На рисунке 13 представлены электрофоретические спектры гордеинов сорта Омский 86, а также сортов Донецкий 8 и Приишимский, от

скрещивания которых он был получен. Как видно из рисунка, сорта Донецкий 8 и Приишимский различаются по блокам компонентов, контролируемым аллелями локусов *Hrd A* (блоки компонентов HRD A28 и HRD A2 соответственно) и *Hrd B* (блоки компонентов HRD B19 и HRD B1 соответственно). У сорта Омский 86 присутствуют два биотипа, отличающиеся по блокам компонентов, контролируемым аллелями только локуса *Hrd A*: 1 – HRD A2 B1 F3, 2 – HRD A28 B1 F3. Это может объясняться тем, что родоначальное растение сорта Омский 86 было гетерозиготным по локусу *Hrd A* и гомозиготным по локусу *Hrd B*. В результате расщепления гетерозигот в последующих поколениях и возникли два биотипа, различающиеся только по аллелям локуса *Hrd A*.

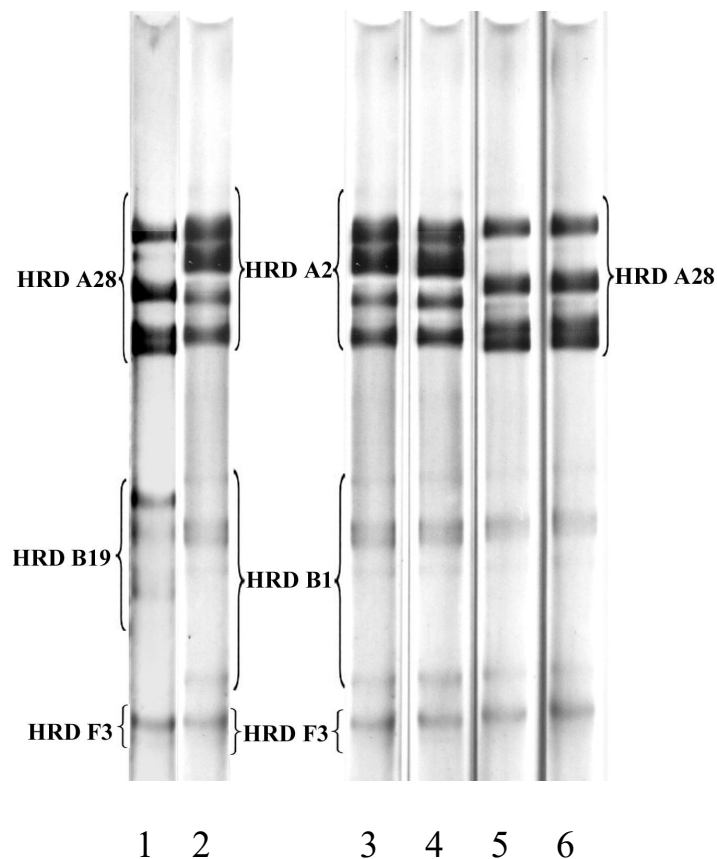


Рис 13. Электрофореграммы гордеина сортов ячменя:

1 – Донецкий 8 (HRD A28 B19 F3); 2 – Приишимский (HRD A2 B1 F3);
3-6 – Омский 86 (3-4 – HRD A2 B1 F3, 5-6 – HRD A28 B1 F3).

В качестве примера сорта, имеющего более сложную структуру популяции по гордеин-кодирующим локусам, может служить сорт Московский 3 (рис. 14). Этот сорт состоит из четырех биотипов, различающихся по блокам компонентов, контролируемым аллелями локуса *Hrd A* (HRD A2 и HRD A21) и локуса *Hrd B* (HRD B19 и HRD B25). Два биотипа по формулам гордеина идентичны родительским сортам Вуни (HRD A2 B19 F1) и Топаз (HRD A21 B25 F1), а два других биотипа (HRD A2 B25 F1 и HRD A21 B19 F1) являются рекомбинантными по локусам *Hrd A* и *Hrd B*.

При анализе гордеинов гетерогенных сортов необходимо отметить и еще одну особенность. Она заключается в том, что, исследуя ограниченную выборку семян, не всегда можно обнаружить все теоретически ожидаемые биотипы. Это касается биотипов, возникающих в результате рекомбинации между тесно сцепленными локусами – *Hrd A* и *Hrd G* (величина рекомбинации между ними составляет 1,5%), локусами *Hrd B* и *Hrd C, D, E, F* (величина рекомбинации составляет от 0,2 до 1,5%). Таким образом, понимание закономерностей наследования гордеинов позволяет различать гетерогенность сорта, обусловленную особенностями его выведения и неоднородность, возникшую в результате засорения.

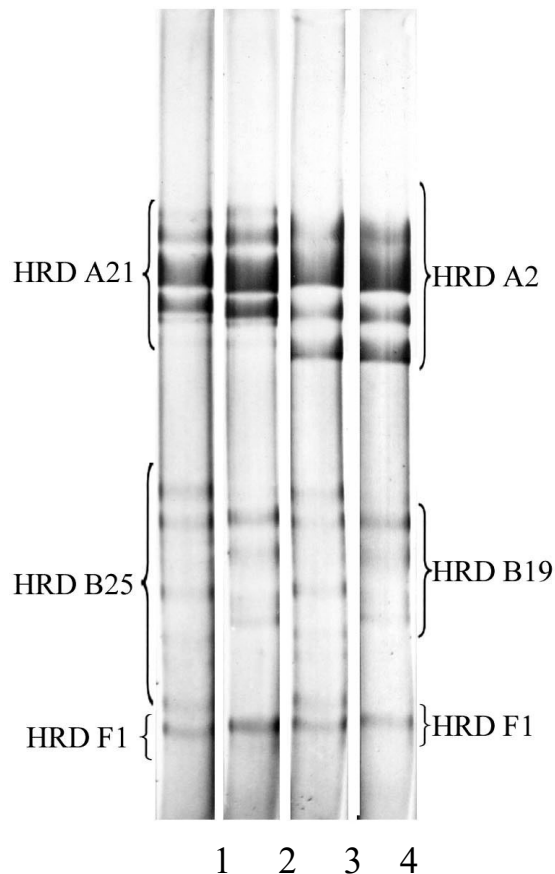


Рис. 14. Электрофоретические спектры гордеинов биотипов сорта Московский 3: 1, 4 – биотипы, идентичные по электрофореграммам гордеинов родительским сортам Топаз и Вуни соответственно; 2, 3 – биотипы, рекомбинантные по локусам *Hrd A* и *Hrd B*. Общая формула гордеинов сорта Московский 3: HRD A2+21 B19+25 F1.

4. Определение сортовых качеств семян ячменя

При анализе сортовых качеств партий семян от средней пробы семян случайным образом берут 100 зерновок и проводят электрофоретический анализ гордеинов каждого из них.

В случае если электрофоретические спектры гордеинов исследованных зерен отличаются от электрофореграмм эталона, то партия семян признается не соответствующей заявленному сорту. На рисунке 15 представлены результаты анализа образца от партии семян элиты сорта Гонар (согласно

сопроводительным документам), полученного из Свердловской области. Гордеины всех 100 исследованных зерновок характеризовались одним вариантом электрофореграммы (рис. 15; электрофореграммы 1, 2). Из рисунка видно, что электрофоретические спектры гордеинов эталона и исследуемой партии этого сорта различаются по блокам компонентов гордеинов А и В. Так, на электрофореграмме гордеина эталона присутствуют блоки компонентов, контролируемые аллелями *Hrd A2*, *Hrd B19*, *Hrd F3*, а на электрофоретических спектрах гордеинов, выделенных из семян исследуемого образца – *Hrd A23*, *Hrd B29* и *Hrd F3*. Следовательно, представленный образец семян элиты не относится к заявленному сорту Гонар.

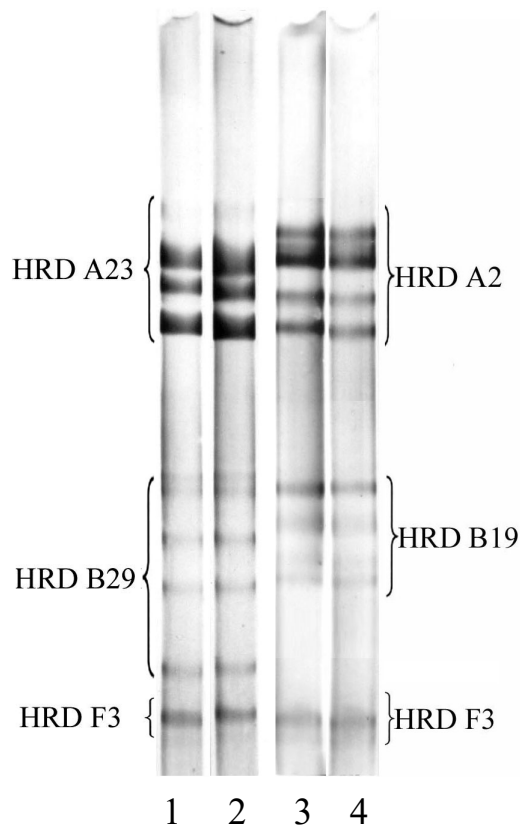


Рис. 15. Электрофоретические спектры гордеинов: 1, 2 – у семян, заявленных как сорт Гонар; 3, 4 – у семян эталонного образца сорта Гонар.

В случае если среди полученных электрофоретических спектров гордеинов у зерен исследуемой партии встречаются электрофореграммы, идентичные эталонным, а также отличающиеся от них, то подсчитывается число нехарактерных для сорта электрофоретических спектров, что и будет характеризовать долю примеси. Например, при анализе 100 зерен от среднего образца партии семян элиты сорта Пасадена из Липецкой области, было обнаружено, что электрофореграммы гордеинов 90 зерновок соответствовали эталону (рис. 16; электрофореграммы 1, 2), а спектры гордеинов 10 зерновок отличались от эталона по аллелям локусов *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F* (рис. 16; электрофореграммы 3, 4). Этот вариант электрофоретических спектров

гордеинов не относится к сорту Пасадена, а принадлежит сорту Жозефин. Таким образом, сортовая чистота исследованной партии составила 90%.

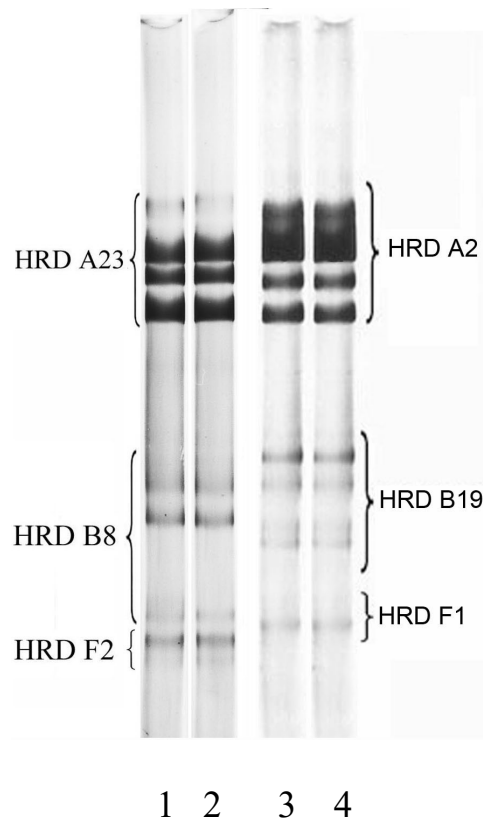


Рис. 16. Результаты электрофоретического анализа гордеинов 100 зерновок от партии семян элиты сорта Пасадена из Липецкой обл.: 1, 2 – электрофореграммы гордеинов, соответствующие сорту Пасадена (90%); 3, 4 – электрофореграммы примеси, обнаруженные в партии семян элиты сорта Пасадена (10%).

4.1. Выборка семян для определения сортовых качеств

Важнейшим фактором при определении сортовой чистоты партий семян является размер выборки анализируемых зерен. Предполагается, что, во-первых, результаты электрофоретического анализа альтернативны – различия в спектрах эталонного и исследованного образцов есть или нет. Во-вторых, результаты электрофоретического анализа свободны от методических ошибок экспериментов (полная воспроизводимость электрофоретического анализа). Поэтому точность определения примесей обусловлена только случайными вариациями ее в анализируемом образце. Следовательно, оценка сортовой чистоты будет тем точнее, чем больше выборка проанализированных семян конкретного образца. Вместе с тем выборка должна быть разумной по величине, т.к. слишком большой размер неизбежно отразится на длительности и стоимости анализа. ISTA (Cook, 1992) рекомендует использовать для простой проверки идентичности главной составляющей партии семян заявленному сорту выборку из 50

зерновок, для оценки партий семян на сортовую чистоту – из 100, а для большей точности – еще большую выборку семян. При этом верхний предел не оговаривается.

В силу случайности отбора зерновок для анализа, полученные результаты будут отражать наличие примесей в исследуемой партии семян с некоторой ошибкой при том или ином уровне статистической надежности (или уровне вероятности). В сельскохозяйственной практике принято опираться на 95%-ный уровень вероятности (или 5%-ный уровень значимости). Это означает, что риск сделать ошибочное заключение при оценке результатов анализа составляет 5%.

Нередко при оценке чистоты партии семян используют метод расчета ошибки выборочной доли. Вычисляют процентное содержание примеси в исследованной выборке:

$$p = \frac{k}{n}.$$

Затем рассчитывают ошибку выборочной доли по формуле:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(100-p)}{n}}, \text{ где}$$

k - число зерен примеси;

p - процент примеси;

n - число проанализированных семян.

Пределы, в которых с вероятностью 95% лежит истинное значение доли примеси в анализируемой партии, рассчитывают как

$$p \pm t_{0,05} \cdot S_p, \text{ где}$$

$t_{0,05}$ - критерий Стьюдента при 5%-ном уровне значимости при $(n-1)$ степенях свободы. При выборке **100** семян $t_{0,05}$ всегда равен **1,98** (Доспехов, 1985).

Пример. При электрофоретическом анализе 100 зерен из среднего образца партии семян сорта А было обнаружено, что 25 из них имеют спектры запасных белков, не характерные для данного сорта, т.е. относятся к примеси. В этом случае доля примеси составляет 25% ($p=25\%$). Тогда:

$$S_p = \sqrt{\frac{25(100-25)}{100}} = \pm 4,3;$$

$$p \pm 1,98 \cdot 4,3 = \pm 8,6 \quad \text{или} \quad 25 \pm 8,6\%.$$

Это значит, что истинная доля примеси в анализируемой партии семян лежит в пределах от 16,4% до 33,6% при уровне вероятности 95%.

Однако расчет ошибки выборочной доли правомерен лишь в случае, когда примесь составляет более 20% ($p > 20$). При значениях $p < 20$ оценка S_p получается искаженной. Это можно продемонстрировать на следующем примере.

Пример. При электрофоретическом анализе 100 зерен из среднего образца партии семян сорта В было обнаружено, что 3 из них имеют спектры запасных белков, не характерные для данного сорта, т.е. относятся к примеси. В этом случае доля примеси составляет 3% ($p=3\%$). Тогда:

$$S_p = \sqrt{\frac{3(100-3)}{100}} = \pm 1,70;$$

$$p \pm 1,98 \times 1,70 = p \pm 3,4 \quad \text{или} \quad 3 \pm 3,4\%.$$

Таким образом, получается, что истинная доля примеси в анализируемой партии семян лежит в пределах от $-0,4\%$ до $6,4\%$. Однако ясно, что доля примеси не может быть с отрицательным знаком.

Поэтому в случае, когда процент примеси низок ($p < 20\%$), для определения доверительного интервала p используют точные формулы для нахождения его верхней p_v и нижней p_n границ. С доверительной вероятностью $(1-\alpha)$ параметр p лежит в пределах $p_n < p < p_v$:

$$p_v = \frac{v_1 \cdot F_{\alpha/2}}{v_2 + v_1 \cdot F_{\alpha/2}}, \text{ где}$$

α - уровень значимости (в нашем случае 5% или 0,05);

$F_{\alpha/2}$ - значение величины F при:

$$v_1 = 2(k+1)$$

$$v_2 = 2(n-k), \quad \text{где}$$

k - число зерен примеси

n - общее число проанализированных семян.

$$p_n = \frac{v_2}{v_2 + v_1 \cdot F_{\alpha/2}}, \text{ где}$$

$F_{\alpha/2}$ - значение величины F при:

$$v_1 = 2(n - k + 1)$$

$$v_2 = 2k$$

Пример. При электрофоретическом анализе 100 зерен из средней пробы партии семян сорта С ($n=100$) было обнаружено 1 зерно, отнесенное по спектру запасных белков к примеси ($k=1$). Определить 95%-ный доверительный интервал для доли примеси в анализируемой партии семян.

Точечная оценка p (доля примеси) равна 0,01 или 1%. Для нахождения верхней границы интервала p_v рассчитывают:

$$v_1 = 2(k+1) = 2(1+1) = 4$$

$$v_2 = 2(n-k) = 2(100-1) = 198.$$

Затем из таблицы $F_{0,025}$ - распределения, имеющейся в справочниках по статистике (например, Н.В. Готов и др., 1982), находят значение $F_{0,025}$ при $v_1=4$, $v_2=198$ ($F_{0,025} = 2,89$). Тогда:

$$p_{\text{в}} = \frac{4 \cdot 2,89}{198 + 4 \cdot 2,89} = 0,055 \quad \text{или } 5,5\%.$$

Для нахождения нижней границы интервала $p_{\text{н}}$ рассчитывают:

$$v_1 = 2(n - k + 1) = 2(100 - 1 + 1) = 200$$

$$v_2 = 2k = 2 \cdot 1 = 2$$

Затем из таблицы F -распределения находят значение $F_{0,025}$ при $v_1=200$, $v_2=2$. Тогда:

$$p_{\text{н}} = \frac{2}{2 + 200 \cdot 39,5} = 0,0003 \quad \text{или } 0,03\%.$$

Таким образом, 95%-ный доверительный интервал оценки чистоты партии семян сорта С от 0,03% до 5,5%. Это говорит о том, что реальная доля примеси в исследуемой партии может достигать 5,5%. Ниже в таблице 4 приведены границы 95%-ного доверительного интервала для выборки 100 зерен при различной доле обнаруженной примеси.

Таблица 4

Границы 95%-ного доверительного интервала при $n=100$ и при различном количестве обнаруженной примеси

Число зерен примеси, k	Границы интервала, %		Число зерен примеси, k	Границы интервала, %	
	$p_{\text{н}}$	$p_{\text{в}}$		$p_{\text{н}}$	$p_{\text{в}}$
0	0	3,7	6	2,2	12,6
1	0,03	5,5	7	2,8	14,3
2	0,2	7,1	8	3,5	15,1
3	0,6	8,7	9	4,2	16,7
4	1	10,1	10	4,9	18,2
5	1,6	11,7	11	5,6	19,7

Очевидно, что с практической точки зрения интерес представляют верхние границы интервала доли возможных примесей в партии ($p_{\text{в}}$). При выборке для анализа в 100 зерен ($n = 100$) значения верхней границы интервала доли возможных примесей представляются значительными. Однако увеличение выборки даже в три раза не решает этой проблемы. Например, в случае не обнаружения примеси ($k = 0$) в выборке из 300 зерен ($n = 300$), значение верхней границы интервала $p_{\text{в}} = 1,2$, что превышает долю примеси, допускаемую существующим стандартом (0,3%). При этом следует помнить о соответствующем увеличении стоимости анализа.

Нами был проведен специальный опыт на реальных партиях семян, с целью определить, насколько результаты анализов в нескольких выборках по 100 зерен отличаются между собой. Для этого из средних проб от партий семян элиты сортов Вереск и Челябинский 96, где анализ первых 100 зерен показал чистоту 99%, были проанализированы еще 300 и 200 зерен

соответственно (табл. 5). Как видно из таблицы, в этом эксперименте варьирование оценок чистоты партий не превышало 2%.

Таблица 5

Значения оценок сортовой чистоты партий элитных семян сортов
Вереск и Челябинский 96 в повторностях выборки из 100 зерен

Сорт	Повторность	Сортовая чистота, %
Вереск	1 (100 зерен)	99
	2 (100 зерен)	100
	3 (100 зерен)	98
	4 (100 зерен)	100
	Средняя оценка	99,25
Челябинский 96	1 (100 зерен)	99
	2 (100 зерен)	100
	3 (100 зерен)	99
	Средняя оценка	99,33

4.2. Анализ гетерогенных по электрофореграммам гордеинов сортов

Как отмечалось выше, около четверти современных сортов ячменя, допущенных к использованию в России, являются гетерогенными и состоят из нескольких биотипов, различающихся по электрофоретическим спектрам гордеинов. Очевидно, что при анализе таких сортов из-за статистических ошибок возможны некоторые изменения соотношения биотипов (табл. 6).

Таблица 6

Встречаемость биотипов в различных партиях семян элиты сорта
Московский 3 из Ярославской области (урожай 2001 и 2002 гг)

Сорт	Биотипы							
	Hrd A21B25F1		Hrd A21B19F1		Hrd A2B25F1		Hrd A2B19F1	
Московский 3	зерен	S_p	зерен	S_p	Зерен	S_p	зерен	S_p
Партия 1 (2001 г)	61	$\pm 9,7$	3	$0,6 \div 8,7^*$	23	$\pm 8,3$	13	$\pm 6,6$
Партия 2 (2001 г)	60	$\pm 9,7$	2	$0,2 \div 7,1^*$	23	$\pm 8,3$	15	$\pm 7,1$
Партия 3 (2002 г)	72	$\pm 8,9$	2	$0,2 \div 7,1^*$	18	$\pm 7,6$	8	$3,5 \div 15,1^*$
Партия 4 (2002 г)	74	$\pm 8,7$	0	$0 \div 3,7^*$	17	$\pm 7,4$	9	$4,2 \div 16,7^*$
Партия 5 (2002 г)	72	$\pm 8,9$	0	$0 \div 3,7^*$	18	$\pm 7,6$	10	$4,9 \div 18,2^*$

Примечание: S_p – ошибка выборочной доли для 95%-ного уровня вероятности;

- – границы 95%-ного доверительного интервала для биномиального распределения.

В то же время, при длительном репродуцировании гетерогенного сорта в каких то условиях может произойти существенное изменение структуры его популяции. Однако это может относиться скорее к товарным, чем к семенным посевам в связи со сроками их репродуцирования. Использование

электрофореза позволило бы контролировать гетерогенные сорта уже на первых этапах семеноводства и не допустить существенного изменения в соотношении их биотипов, предотвращая возможное изменение хозяйственных характеристик сортов.

4.3. Дифференциация сортов по электрофоретическим спектрам гордеинов

Как видно из таблицы 3 и представленных в приложении электрофореграмм гордеинов, часть сортов ячменя не различаются методом электрофореза гордеина. Поскольку сорта допускаются к использованию в конкретных регионах, важно знать, сколько и какие сорта не отличаются по запасным белкам в том или ином регионе. В таблице 8 приведены данные о различимости сортов в регионах РФ. Как видно из таблицы, в двух регионах

Таблица 8

Дифференциация методом электрофореза гордеинов сортов ярового ячменя, допущенных к использованию в различных регионах РФ

Регион	Число сортов, шт.	Всего групп различимых сортов	Группы, включающие более одного сорта*
(I) Северный	5	5	-
(II) Северо-Западный	22	18	1 группа – 4 сорта 1 группа – 2 сорта
(III) Центральный	34	23	1 группа – 6 сортов 2 группы – по 3 сорта 2 группы – по 2 сорта
(IV) Волго-Вятский	27	17	1 группа – 8 сортов 1 группа – 3 сорта 1 группа – 2 сорта
(V) Центрально-Черноземный	40	33	1 группа – 4 сорта 1 группа – 3 сорта 2 группы – по 2 сорта
(VI) Северо-Кавказский	24	14	1 группа – 4 сорта, 1 группа – 3 сорта 3 группы по 2 сорта
(VII) Средневолжский	24	17	1 группа – 4 сорта 4 группы – по 2 сорта
(VIII) Нижневолжский	18	10	1 группа – 5 сортов 1 группа – 3 сорта 2 группы по 2 сорта
(IX) Уральский	22	16	1 группа – 4 сорта 1 группа – 2 сорта
(X) Западно-Сибирский	28	20	1 группа – 6 сортов 3 группы – по 2 сорта
(XI) Восточно-Сибирский	21	16	1 группа – 3 сорта 3 группы – по 2 сорта
(XII) Дальневосточный	12	12	-

*Примечание – указаны группы, объединяющие два и более сортов, идентичных по электрофореграммам гордеинов

(I и XII) все допущенные к использованию сорта различаются по электрофоретическим спектрам гордеинов. В остальных девяти регионах есть группы, включающие по 2 – 8 сортов, идентичных по электрофореграммам гордеинов. В Центральном (III), Волго-Вятском (IV), Нижневолжском (VIII) и Западно-Сибирском (X) регионах обнаружены по одной группе, включающей 6, 8, 5 и 6 сортов, соответственно, не различающихся по спектрам гордеинов. Например, в Центральном (III) регионе 34 допущенных к использованию сорта, по данным электрофореза, разделяются на 23 группы (табл. 8). В 18 групп входит по одному сорту, поскольку каждый из них по электрофоретическим спектрам гордеинов отличается от всех остальных сортов, допущенных к использованию в этом регионе. Однако в одну группу объединяются 6 сортов – БИОС-1, Велес, Джин, Мессина, Михайловский и Сонет, характеризующиеся формулой гордеина HRD A2 D8 A2. Две группы составляют тройки сортов: Аннабель, Данута, Зевс (HRD A2 B17 F3) и Жозефин, Московский 2, Толар (HRD A2 B19 F1). Еще в две группы объединяются сорта Атаман, Беатрис (HRD A23 B8 F2) и Владимир, Нур (HRD A2 B25 F1). Такая ситуация, казалось бы, ограничивает возможность использования электрофореза гордеинов как метода лабораторного контроля сортовых качеств семян ячменя. Однако каждый из входящих группу идентичных между собой по гордеинам сортов, отличается по электрофоретическим спектрам от остальных, за исключением тех сортов, с которыми он идентичен по формулам гордеина. В свою очередь, каждый из 18 сортов, имеющих уникальную формулу гордеина, отличается по электрофореграммам запасных белков от остальных 33 сортов, используемых в регионе. Конечно, нельзя исключить возможную путаницу между одинаковыми по гордеинам сортами или их взаимное засорение, которое не удастся обнаружить с помощью электрофореза гордеинов. Для групп сортов, не различающихся по электрофореграммам гордеина, в настоящее время разрабатываются дополнительные белковые маркеры для их идентификации (рис. 17).

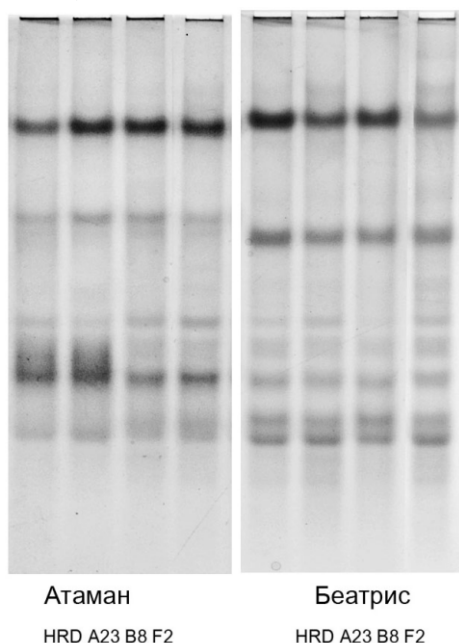


Рис. 17. Дифференциация сортов ячменя Атаман и Беатрис, идентичных по электрофореграммам гордеина, с помощью дополнительных белковых маркеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул М.: Мир, 1982.- 448 с.
2. Глотов Н. В., Животовский Л. А., Хаванов Н. В., Хромов-Борисов Н. Н. Биометрия. – Л., 1982. – 263 с.
3. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985.- 351 с.
4. Конарев В.Г., Дягилева Г.Е., Гаврилюк И.П., Трофимовская А.Я. Сортная идентификация ячменя по электрофоретическим спектрам гордеина// Бюллетень Всесоюзн. Института растениеводства им. Н.И. Вавилова. 1979. В. 92. С. 30-40.
5. Нецветаев В.П., Образцов И.С., Созинов А.А. Картирование локуса Hrd G в хромосоме 5 ячменя. В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. V Всесоюзн. симп. Тез. Докл. М.: Наука. 1983. С. 110.
6. Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Попереля Ф.А., Созинов А.А. Идентификация шестого локуса, контролирующего синтез гордеина у озимого ячменя// Докл. ВАСХНИЛ. 1983. № 1. С. 7-11.
7. Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Созинов А.А. Полиморфизм культурного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) по гордеинам// Генетика. 1985. Т.21. № 4. С.629-639.
8. Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Ладогина М.П., Калабушкин Б.А. Полиморфизм гордеинов у сортов ярового ячменя// Генетика. 1994. Т.30. № 5. С. 604-614.
9. Поморцев А.А. Исследование полиморфизма гордеинов у ячменей Эфиопии// Генетика. 2001. Т. 37. № 10. С. 1371-1382.
10. Поморцев А.А., Калабушкин Б.А., Терентьева И.А. Полиморфизм гордеинов у ячменей Северной Африки// Генетика. 2002. Т. 38. №11. С. 1498 – 1510.
11. Созинов А.А., Нецветаев В.П., Григорян Э.М., Образцов И.С. Картирование локусов Hrd у ячменя (*Hordeum vulgare* L. emed. Vav/ et Vach.)// Генетика. 1978. Т. 14. № 9. С. 1610 – 1619.
12. Созинов А.А., Попереля Ф.А. Методика вертикального дискового электрофореза в крахмальном геле и генетический принцип классификации глиадинов. Одесса: 1978. 16 с.
13. Cook R. J. Handbook of variety testing. Electrophoresis handbook: variety identification. - ISTA, 1992. - 25P.
14. Kapala A. Variability of electrophoretic subunit patterns of hordein proteins in spring barley (*Hordeum vulgare* L.)// Genetica Polonica. 1981. V. 22. N. 2. P. 163-176.
15. Marchylo B.A. and Laberge D.E. Barley cultivar identification by electrophoretic analysis of hordein proteins II. Catalogue of electrophoregram formulae for Canadian-grown barley cultivars// Can. J. Plant Sci. 1981. V. 61. P. 859-870.

16. Nevo E., Beiles A., Storch N. Microgeographic edaphic differentiation in hordein polymorphism of wild barley// Theor. Appl. Genet. 1983. V64. P. 123-132.
17. Nielsen G. and Johansen H.B. Proposal for identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isoenzyme loci of 47 reference varieties// Euphytica. 1986. V. 35. P. 717-728.
18. Shewry P.R., Bunce N.A.C., Kreis M., Forde B.G. Polymorphism at the Hor 1 locus of barley (*Hordeum vulgare* L.)// Biochemical Genetics. 1985. V.23. N. 5/6. P. 391-403.