

ГЕНЕТИКА

УДК 575.174.015.3

*А.А. Поморцев, доктор
биологических наук;*

*Е.В. Лялина, кандидат биологиче-
ских наук*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ СОРТОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СОРТОВОЙ ЧИСТОТЫ ПАРТИЙ СЕМЯН И ТОВАРНОГО ЗЕРНА ПИВОВАРЕННОГО ЯЧМЕНЯ

Изложены принципы проведения лабораторного сортового контроля ячменя с использованием электрофореза гордеинов. Представлены результаты оценки сортовой чистоты 165 семенных и 833 товарных партий зерна ячменя, полученные в Испытательной лаборатории Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН в 2005 – 2008 гг. Сделан вывод об эффективности использования лабораторного сортового контроля и о необходимости разработки системы генетических маркеров с целью полной идентификации сортов ячменя.

These are stated principles of conducting laboratory variety's control of barley with the usage of hordeins electrophoresis. These are produced results of variety purity evaluation of 165 seeding and 833 commodity barley batches received in a testing laboratory of the Institute of Common Genetics after N.A. Vavilov of Russian Academy of Science in 2005-2008. It is made a conclusion about laboratory variety's control usage effectiveness and about a necessity of genetic markers system elaboration to identify barley varieties.

***Ключевые слова:** ячмень, гордеины, электрофорез, сортовой контроль, биотип, locus, водорастворимые белки.*

***Key words:** barley, hordeins, electrophoresis, variety control, biotype, locus, water-soluble proteins.*

Введение. Современная пивоваренная и солодовенная промышленности предъявляют высокие требования к сортовой чистоте зерна пивоваренных сортов ячменя. Исследованиями, проведенными Московским государственным университетом пищевых производств и ОАО «Русский солод» [1], показано, что наиболее важные характеристики качества солода – экстрактивность и фриабельность, тесно связаны с уровнем сортовой чистоты, кото-

рый не должен быть менее 90%, а согласно требованию европейских стандартов, сортовая чистота должна быть не ниже 95% [2]. Очевидно, что столь высокие требования по сортовой чистоте товарных партий пивоваренного ячменя невозможно удовлетворить без соответствующего уровня семеноводства и организации производства товарного зерна. Основными методами определения сортовых качеств семян (сортовой принадлежности и сортовой чистоты) в России являются апробация и грунтовой контроль. Однако эти методы позволяют оценить сортовую принадлежность и сортовую чистоту только посевов. Вместе с тем, начиная с момента уборки и до реализации, семена проходят ряд технологических этапов (уборку, транспортировку, подготовку, хранение и т.д.). На каждом из них возможно появление сортовой примеси. В результате сортовая чистота, определенная, например, путем апробации, и реальная чистота семян к моменту их реализации могут значительно различаться, а в некоторых случаях возможна и просто путаница семян разных сортов.

Федеральным законом «О семеноводстве» наряду с апробацией посевов и грунтовым контролем предусмотрено введение лабораторного сортового контроля для определения сортовых качеств элитных и репродукционных семян сельскохозяйственных растений, поступающих в оборот. В Российской Федерации в качестве метода лабораторного сортового контроля семян ячменя используется электрофорез спирторастворимых запасных белков зерна – гордеинов [3]. В статье изложены принципы проведения лабораторного сортового контроля с использованием электрофореза гордеинов, результаты работы за последние годы Испытательной лаборатории Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, аккредитованной в Системе сертификации семян с 2000 г., а также некоторые вопросы, возникающие при проведении лабораторного сортового контроля в настоящее время.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили эталонные образцы сортов ярового ячменя, включенных в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в России в

2000 – 2008 гг., которые были получены от ФГУ «Государственная комиссия РФ по испытанию и охране селекционных достижений». Кроме этого, исследовали средние образцы от партий ячменя, полученных от 87 хозяйств, государственных семенных инспекций, организаций-производителей пивоваренного ячменя, солодовенных и пивоваренных заводов из 32 республик, краев и областей Российской Федерации. Из каждого образца случайно отбирали 100 зерен, в каждом из которых гордеины анализировали методом электрофореза в крахмальном геле в алюминий-лактатном буфере с рН 3,1 в присутствии 3М мочевины. После электрофореза гели фиксировали в 5%-м растворе ТХУ, окрашивали в 2%-м растворе водорастворимого нигрозина и отмывали в проточной водопроводной воде [3, 4].

Результаты. Для электрофоретического анализа гордеинов в мире применяют более 20 различных методов электрофореза и их модификаций [5]. Используют и различные подходы для интерпретации и регистрации электрофоретических спектров гордеинов. Одна из первых номенклатур была предложена В.Г. Конаревым с сотрудниками [6], основанная на сравнении белковых компонентов на электрофореграмме проламинов у исследуемого сорта и эталонного спектра, составленного в результате анализа глиадинов большого числа сортов и биотипов пшеницы и ее сородичей. По этому эталону, указывая номера позиций на электрофореграмме, занятые белковыми компонентами, может быть записан спектр гордеина любого сорта в виде сортовой белковой формулы. Аналогичный принцип регистрации электрофореграмм гордеина, но только с использованием как эталона сравнения спектра гордеина конкретного сорта (Атем), предложил R.J. Cook [5]. Эти способы позволяют регистрировать электрофоретические спектры в виде формул, создавать базы данных, но не несут генетической информации. Некоторые исследователи получаемые варианты электрофореграмм гордеинов привязывают к соответствующим сортам и затем обозначают эти спектры цифрами [7].

Другой подход основывается на знании наследования и генетического контроля гордеинов. Наиболее полная информация о генетическом контроле гордеинов получена при использовании метода электрофореза в крахмальном геле. Показано, что компоненты гордеина наследуются группами (блоками) и контролируются семью сцепленно наследуемыми локусами – *Hrd A*, *Hrd B*, *Hrd C*, *Hrd D*, *Hrd E*, *Hrd F*, *Hrd G*, локализованными в хромосоме 5 ячменя [8, 9, 10]. Три из этих локусов – *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F* имеют серии аллелей, контролирующие соответственно 150 вариантов блоков компонентов гордеина А, 259 – гордеина В и 5 – гордеина F [11]. Аллели полиморфных локусов и соответствующие им варианты блоков компонентов гордеинов А, В и F обозначаются цифрами в порядке обнаружения при анализе коллекции. Это позволяет записывать электрофореграммы гордеина сортов в виде простых генетических формул (рис. 1), а известное разнообразие вариантов гордеинов А, В и F позволяет теоретически различить 194250 сортов.

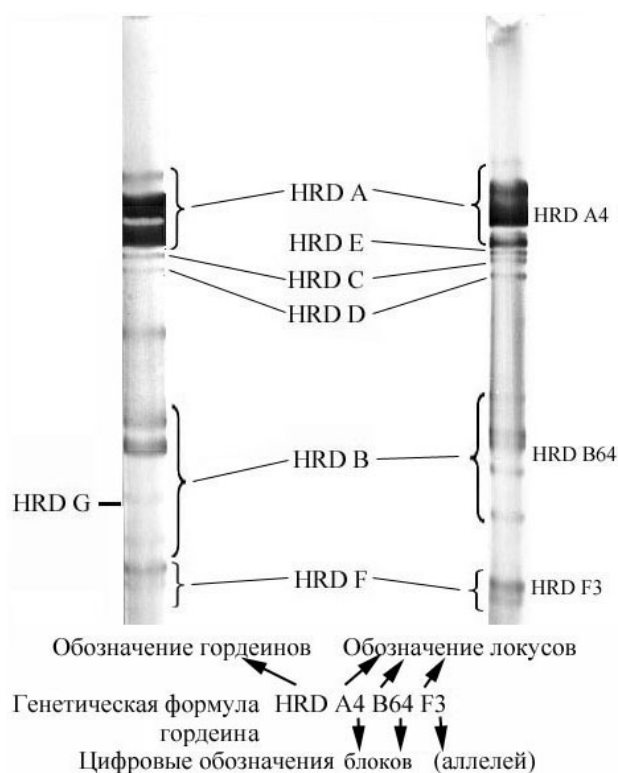


Рис.1. Генетический контроль электрофоретических компонентов гордеинов и способ записи электрофореграмм в виде генетических формул гордеина.

Как видно из рис. 1, на электрофореграмме блоки компонентов, контролируемые полиморфными локусами, разделены пространственно, что позволяет создавать каталоги вариантов гордеинов А, В и F (рис. 2). Созданные каталоги, с одной стороны, позволяют регистрировать электрофореграммы сортов в виде генетических формул, и, наоборот, по формуле легко представить электрофореграмму гордеина сорта. Электрофоретические спектры гордеина сортов ячменя, включенных в Государственный реестр, представлены на сайте Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (www.vigg.ru) в разделе «Инновационные проекты».

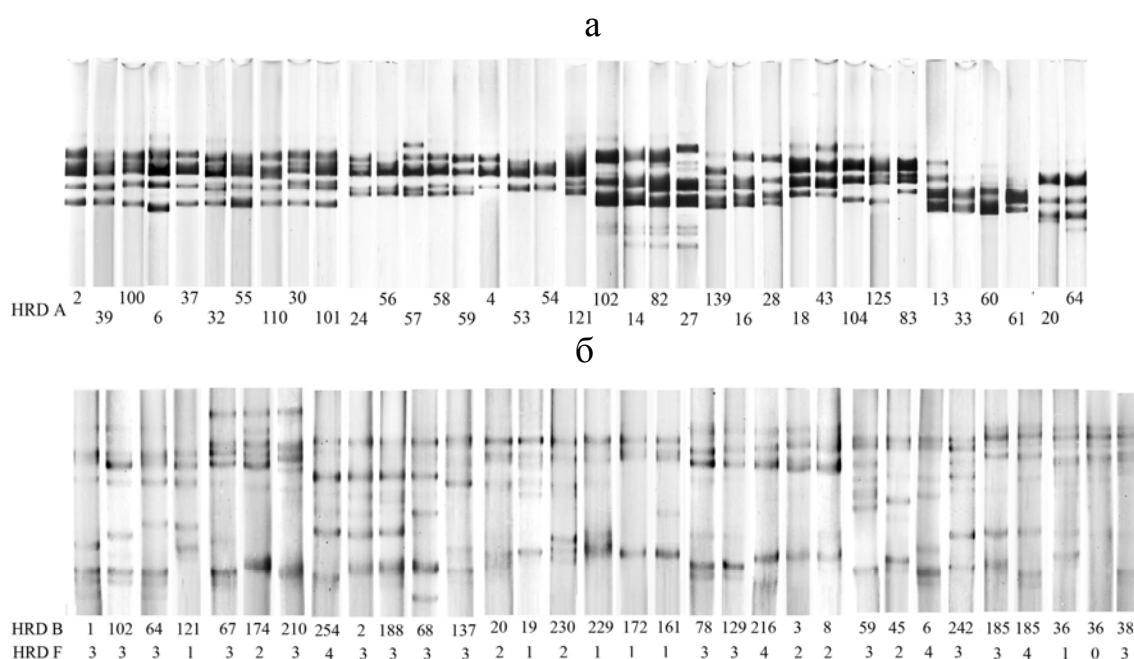


Рис. 2. Фрагмент каталога вариантов блоков компонентов:
а – гордеина А, б – гордеинов В и F.

Как показывают наши исследования, до 30% сортов ячменя, включенных в реестр, являются гетерогенными по гордеинам и представлены несколькими биотипами, различающимися по электрофореграммам запасных белков. Генетический подход позволяет отличить гетерогенность, обусловленную особенностями создания сорта, и неоднородность, возникшую в результате засорения. Генетически обусловленная гетерогенность возникает в случае, когда родоначальное растение сорта было гетерозиготным по одному, двум или трем гордеиновым локусам. В зависимости от этого сорт может со-

стоять из двух, четырех или восьми биотипов соответственно. Например, сорт Московский 3 состоит из четырех биотипов. Два из них идентичны по электрофореграммам гордеина родительским сортам Вуни и Топаз, а два – являются рекомбинантными по локусам *Hrd A* и *Hrd B* (рис. 3). Это говорит о том, что родоначальное растение сорта было гетерозиготным по локусам *Hrd A* и *Hrd B*. В результате рекомбинации между двумя указанными локусами при расщеплении, гомозиготации популяции сорта и возникли четыре биотипа.

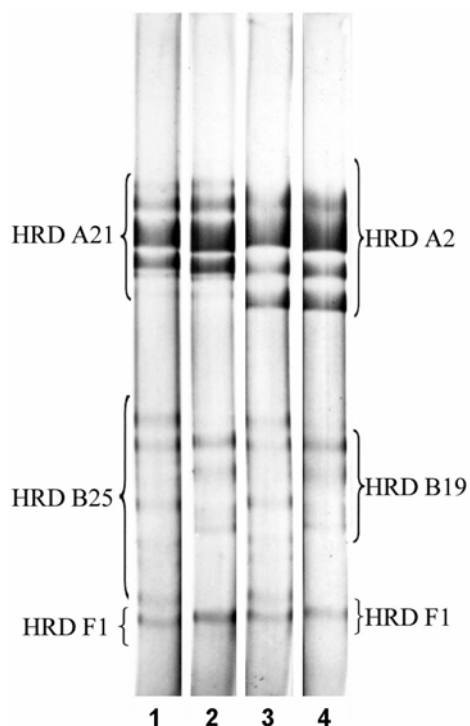


Рис. 3. Электрофореграммы гордеинов биотипов сорта Московский 3: 1- HRD A21 B25 F1 (как сорт Топаз); 2- HRD A21 B19 F1 (рекомбинант); 3- HRD A2 B25 F1 (рекомбинант); 4- HRD A2 B19 F1 (как Вуни).

При исследовании сортовой чистоты партий зерна электрофоретическому анализу подвергаются гордеины из 100 случайно выбранных индивидуальных зерен. В случае, если полученные электрофореграммы не соответствуют электрофоретическим спектрам гордеина эталонного образца исследуемого сорта, партия признается не соответствующей заявленному сорту (рис. 4а). В случае, когда часть электрофореграмм гордеина в изучаемой партии соответствует эталону, а часть – нет (рис. 4б), подсчитывают число отличающихся от эталона электрофореграмм, что и будет отражать долю сортовой примеси.

В табл. 1 представлены результаты сортового контроля с использованием электрофореза гордеинов, полученные в 2005 – 2008 гг. Из таблицы видно, что число партий семян, поступивших на анализ в указанный период, было незначительным – от 30 до 57 партий в различные годы. При этом доли партий семян с сортовой чистотой 97 – 100% находились в пределах 57,9 – 86,9%. Заметим, что по сопроводительным документам (акты апробации), сортовая чистота всех исследованных партий семян была не ниже 99,5%.

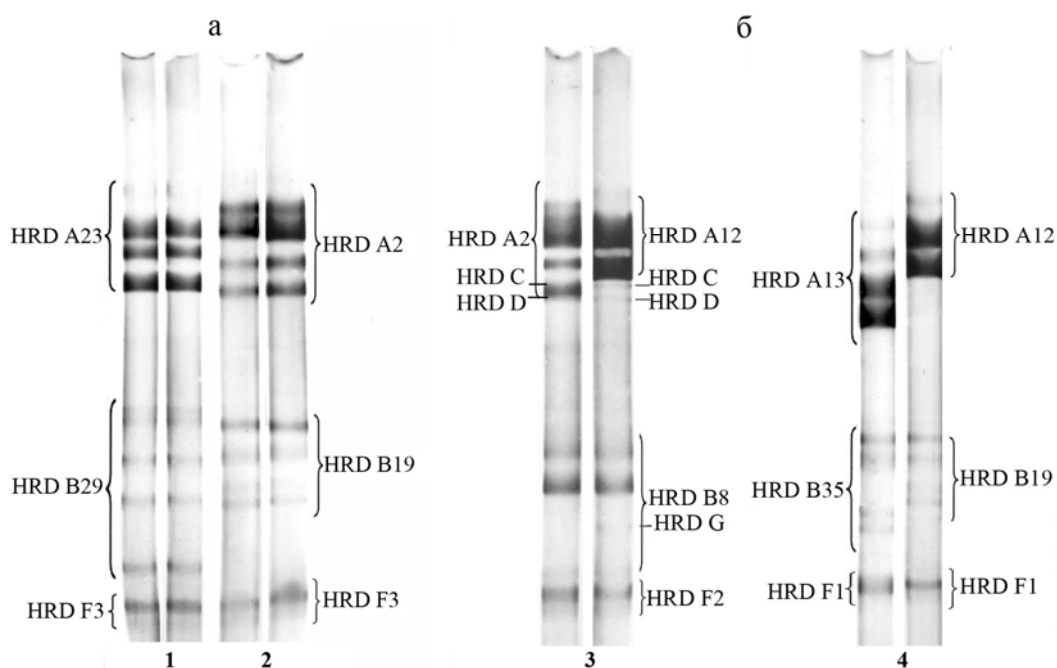


Рис. 4. а – электрофреграммы гордеина, полученные при анализе партии семян элиты сорта Гонар, поступивших из Свердловской области (1) и электрофреграммы гордеина эталонного образца сорта Гонар (2); исследованная партия семян не принадлежит сорту Гонар.; б - электрофреграммы гордеина, полученные при анализе партий семян элиты сорта Одесский 100 из Липецкой области, 3 – принадлежат сорту Одесский 100; 4 – относятся к сортовой примеси.

Как видно из таблицы 1, более востребованным оказался лабораторный сортовой контроль для товарных партий пивоваренного ячменя, предназначенных для соложения – от 90 до 264 партий в разные годы.

1. Доли (%) партий семян и товарного зерна сортов пивоваренного ячменя с различной сортовой чистотой, определенной методом электрофореза запасных белков зерна в 2005-2008 гг.

Сортовая чистота, %	99-100	97-98	95-96	91-94	85-90	81-84	75-80	<74	Не соотв.
2005 г.									
Семена n=40	35,0	27,5	5,0	7,5	10,0	12,5	2,5	0	0
	62,5								
Товарные партии n=254	9,4	9,8	9,0	8,7	10,6	10,6	11,8	13,4	16,5
	28,2								
2006 г.									
Семена n=30	53,3	13,4	10,0	0	6,7	13,3	0	3,3	0
	66,7								
Товарные партии n=264	21,2	9,9	8,3	9,5	7,2	6,1	9,1	24,2	4,5
	39,4								
2007 г.									
Семена n=57	56,1	1,8	1,8	14,0	21,1	0	0	5,2	0
	57,9								
Товарные партии n=90	35,6	18,9	13,3	4,4	3,4	3,4	2,2	14,4	4,4
	67,8								
2008 г.									
Семена n=38	71,1	15,8	0	0	2,6	0	5,3	5,3	0
	86,9								
Товарные партии n=225	24,9	8,9	6,2	12,0	17,8	4,9	7,1	17,3	0,9
	40,0								

Примечание: n- число исследованных партий, «семена» - партии с/элиты, элиты и I - III репродукций в соответствии с документами

При этом доля партий, соответствующих по сортовой чистоте европейским стандартам (95% и более), составляла в разные годы от 28,2 до 67,8%, а доли партий с сортовой чистотой ниже 90% составляли 46 - 47% за исключением 2007 г. Заметим, что в 2007 г. на анализ поступило и наименьшее число партий – 90. Ежегодно при анализе товарного зерна ячменя обнаруживались партии, не соответствовавшие заявленным сортам. Как правило, такие партии

представляли собой смеси иногда до 15 различных сортов. В 2005 г. масса партий, не соответствующих заявленным сортам, составила более 14 тыс. тонн.

В Государственный реестр селекционных достижений с каждым годом включается все большее число сортов ярового ячменя (табл. 2). При этом на долю пивоваренных сортов приходится около 40%. Обращает на себя внимание динамика числа пивоваренных сортов зарубежной селекции. Так, с 2001 г. до 2008 г. их доля от общего числа пивоваренных сортов, включенных в реестр, возросла с 5,3 до 31,0%. Вероятно, это связано с тем, что пивоваренные компании и заводы ориентируются на импортные сорта, поскольку есть мнение, что отечественные сорта по пивоваренным качествам уступают зарубежным.

2. Динамика сортимента ярового ячменя в Государственном реестре

Годы	Сортов, шт.		Доля иностранных пивоваренных сортов, %
	всего	из них пивоваренных	
2001	106	38	5,3
2003	121	47	17,0
2004	124	50	16,0
2005	128	49	18,4
2006	133	57	19,3
2007	137	56	23,2
2008	148	58	31,0

На наш взгляд, одной из причин этого является недостаточный уровень ведения семеноводства. Так, в 2003 – 2004 гг. в институте общей генетики РАН на анализ сортовой чистоты поступило 58 партий семян (оригинальных, с/элиты, элиты, питомников размножения) 17 сортов пивоваренного ячменя отечественной селекции. Из них сортовую чистоту 99-100% имели 48,3% партий, а чистоту 97-98% – 15,5% партий. При этом семена иностранных сортов (Аннабель, Скарлетт, Данута) были представлены всего несколькими партиями. В последующие годы интерес как со стороны семеноводства, так и со стороны производителей пивоваренного ячменя к отечественным сортам

постоянно снижался (табл. 3). Так, если в 2005 г. доля отечественных сортов, семена которых поступили на анализ, составляла 70,0%, а доля партий – 17,0%, то в 2007 г. эти цифры уменьшились, соответственно, до 20,0% и 5,5%, а в 2008 г. партии семян отечественных сортов на анализ вообще не поступали. Что касается товарных партий пивоваренного ячменя, доля партий сортов отечественной селекции, поступивших на анализ, в последние годы не превышала 5,0%. Снижается и доля отечественных сортов, востребованных солодовенной промышленностью (табл. 3).

3. Доли семенных и товарных партий пивоваренного ячменя отечественной и зарубежной селекции, поступивших на лабораторный сортовой контроль

Годы	Семена				Товарные			
	отечественные сорта		зарубежные сорта		отечественные сорта		зарубежные сорта	
	доля сортов, %	доля партий, %	доля сортов, %	доля партий, %	доля сортов, %	доля партий, %	доля сортов, %	доля партий, %
2005	70,0	17,0	30,0	83,0	36,0	2,5	64,0	97,5
2006	36,0	9,0	64,0	91,0	47,0	4,5	53,0	95,5
2007	20,0	5,5	80,0	94,5	33,0	5,0	67,0	95,0
2008	0	0	100,0	100,0	20,0	4,0	80,0	96,0

Таким образом, приведенные в таблице 3 данные свидетельствуют о том, что представленные в таблице 1 результаты лабораторного сортового контроля относятся, прежде всего, к иностранным сортам пивоваренного ячменя. На наш взгляд, современное состояние семеноводства и производства товарного зерна ячменя ведет, с одной стороны, к невостребованности сортов отечественной селекции. С другой стороны, внедрению все новых иностранных сортов, так как среди пивоваров распространено мнение, что со временем сорта «вырождаются». Причиной такого «вырождения» является, прежде всего, сортовое засорение, и, как показывают приведенные нами данные, внедрение все новых иностранных сортов не слишком способствует исправлению существующего положения с сортовой чистотой пивоваренного ячменя.

Рассматривая электрофорез гордеинов как основной метод лабораторного сортового контроля ячменя, следует отметить, что он имеет определенные ограничения, связанные с тем, что в последнее время в реестр включается все больше сортов, которые по электрофоретическим спектрам только гордеинов не различаются. Это является следствием объективного процесса сужения генетического разнообразия в результате селекционной деятельности человека [12]. Для идентификации таких сортов следует использовать дополнительные маркеры. В качестве примера можно привести сорта Скарлетт и Ксанаду.

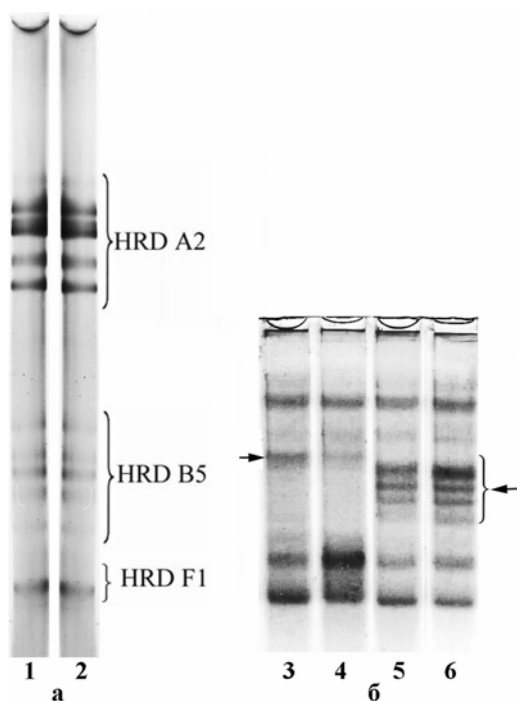


Рис. 5. Электрофореграммы гордеинов (а) и водорастворимых белков (б) сортов: 1, 3, 4 –Скарлетт; 2, 5, 6 – Ксанаду. Стрелками указаны зоны, по которым различаются электрофореграммы альбуминов сортов Скарлетт и Ксанаду.

Эти сорта, как видно из рисунка 5а, не различаются по электрофореграммам гордеина. Вместе с тем, их можно четко дифференцировать, проведя электрофоретический анализ легко растворимых белков эндосперма – альбуминов (рис. 5б).

В целом, представленные данные свидетельствуют об эффективности использования электрофореза белков в качестве метода лабораторного сортового контроля как в семеноводстве, так и в пивоваренной промышленности. Вместе с тем, очевидна необходимость создания системы генетических маркеров, которая позволяла бы максимально полно дифференцировать и идентифицировать сорта ячменя и которая могла бы быть использована в массовых анализах при оценке сортовой чистоты и сортовой принадлежности семенных и товарных партий ячменя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хлыновский А.Д., Ермолаева Г.А., Жаркова Л.П. Значение использования электрофоретического определения сортовой чистоты пивоваренного ячменя// Тр. Междунар. научно-практ. конф. «Современные принципы и методы селекции ячменя». – Краснодар, 2007. – С. 281 - 285.
2. Таразанов В.А. Качественные аспекты получения пивоваренного ячменя// Мат. III Междунар. конгресса «Зерно и хлеб России». – С.-Петербург, 3-15 ноября, 2007. – С. 93.
3. Методика проведения лабораторного сортового контроля по группам сельскохозяйственных растений. –М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2004. – С. 96.
4. Поморцев А.А., Лялина Е.В. Идентификация и оценка сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна. – М.: Изд-во МСХА, 2003 – С. 83.
5. Cook R. J. Handbook of variety testing. Electrophoresis handbook: variety identification. ISTA, 1992, 25p.
6. Конарев В.Г., Дягилева Г.Е., Гаврилюк И.П., Трофимовская А.Я. Сортовая идентификация ячменя по электрофоретическим спектрам гордеина//Бюллетень Всесоюзн. Института растениеводства им. Н.И. Вавилова. – 1979. - В. 92. - С. 30-40.

7. 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.
8. Созинов А.А., Нецветаев В.П., Григорян Э.М., Образцов И.С. Картирование локусов *Hrd* у ячменя (*Hordeum vulgare* L. emed. Vav. et Bach.)// Генетика.- 1978. - Т. 14. - № 9. - С. 1610 – 1619.
9. 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. 7-9.
10. Netsvetaev V.P. and Sozinov A.A. Location of a hordein G locus, *Hrd G*, on chromosome 5 of barley// Barley Genetics Newsletter. 1984. V. 14. P. 4-6.
11. Поморцев А.А. Гордеин-кодирующие локусы как генетические маркеры в популяционных, филогенетических и прикладных исследованиях ячменя// Автореф.... доктора биол. наук. Москва. 2008. 48 с.
12. Алтухов Ю.П., Пухальский В.А., Политов Д.В., Поморцев А.А., Калабушкин Б.А., Упелниек В.П. Динамика популяционных генофондов растений// В кн. Динамика популяций генофондов при антропогенных воздействиях/ под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 2004, с. 295-413.