

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ И
ОБРАЗОВАНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
МОСКОВСКАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА**

**КАФЕДРА СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВА ПОЛЕВЫХ
КУЛЬТУР**

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

**НА ТЕМУ: «Грунтконтроль и лабораторный сортовой контроль семян
ячменя как методы определения их подлинности и чистоты»**

**Исполнитель: студентка 505 группы
V курса агрономического факультета
по специальности 310600 «Селекция и
генетика сельскохозяйственных
культур»,
специализация «Селекция полевых
культур»**

Ремённая Екатерина Андреевна

Научный руководитель:

Профессор Березкин А.Н.

МОСКВА 2004

<http://yadyra.ru>

СОДЕРЖАНИЕ

	СТР.
1. ВВЕДЕНИЕ	3
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
2.1 Общая характеристика методов сортового контроля	5
2.2 Апробация	5
2.3 Лабораторный сортовой контроль	6
2.3.1 Общая характеристика электрофоретических методов	6
2.3.2 Определение электрофореза	9
2.3.3 Выбор белков для сортовой идентификации	9
2.3.4 Целесообразность использования электрофореза	10
2.3.5 Рекомендуемые методы электрофоретического анализа запасных белков	11
2.3.6 Методологические особенности проведения электрофоретического анализа	12
2.3.7 Использование электрофореза	13
2.3.8 Эффективное применение электрофореза при выращивании самоопыленных культур	16
2.3.9 Система регистрации и интерпретация результатов электрофореза	16
2.4 Грунтовой сортовой контроль	21
2.4.1 Особенности грунтового сортового контроля в системе сертификации семян	21
2.4.2 Технологические требования при проведении грунтового контроля	24
2.4.3 Особенности проведения наблюдений на делянках грунтового контроля	25
2.4.4 Основы проведения грунтового контроля по зерновым культурам (кроме кукурузы)	26
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1 Цели и задачи	32
3.2 Материалы и методы	32
3.2.1 Материалы	32
3.2.2 Методика проведения грунтового контроля	33
3.2.3 Методика электрофореза запасных белков ячменя в крахмальном геле, используемая в сортовом контроле	37
3.3 Место и условия проведения эксперимента	43
3.4 Результаты и их обсуждение	44
3.4.1 Результаты по грунт-контролю	44
3.4.2 Результаты анализа по электрофорезу	49
4. ВЫВОДЫ	51
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	52

1. ВВЕДЕНИЕ

Стабильное получение высоких урожаев любой сельскохозяйственной культуры и улучшение качества невозможны без постоянной поддержки и совершенствования системы семеноводства.

Качество семян сельскохозяйственных растений в значительной степени определяет эффективность товарного растениеводства. В условиях рыночной экономики качество семян является одной из главных составляющих их успешного включения в оборот, сферой взаимных интересов патентообладателей на сорт и производителей семян, товарной продукции и её потребителей. Насыщение рынка семенами, повышение степени защиты прав интеллектуальной собственности на сорта растений, перевод отрасли на самофинансирование неизбежно приведет к ситуации, когда будет невозможно реализовать некачественные или фальсифицированные семена. Гарантию высокого качества семян обеспечивает процесс сертификации, введенный по показателям, подтверждающим их сортовые и посевные качества в России с 1 июля 2001 года в соответствии с Федеральным законом «О семеноводстве» [6].

Приказом Минсельхозпрода России от 08.12.99 № 859 «Об утверждении Положения о порядке проведения сертификации семян сельскохозяйственных и лесных растений» обязанности Центрального органа по сертификации семян возложены на Государственную семенную инспекцию Российской Федерации. (Госсеминспекцию) [27].

Право патентообладателя на сорта сельскохозяйственных растений накладывает на него высокую ответственность за качество выпускаемых семян. Только соблюдение определенных требований и условий при воспроизводстве сорта на всех этапах его размножения (соблюдение стандартов на сортовые и посевные качества, нормативных требований к технологии производства семенного материала, оформление соответствующей документации, соблюдение сроков ее хранения) позволяет производить качественные семена. Правильно организованная сортовая сертификация гарантирует качество семян, способствует защите интеллектуальных прав патентообладателя и дает возможность потребителю товарной продукции получать от растениеводства сырье с требуемыми характеристиками, обладателем которых является конкретный сорт. Кроме того, сертификация партий семян, поступающих в торговый оборот, предоставляет патентообладателю возможность сбора селекционного вознаграждения (роялти) [4].

Для регистрации новых сортов и охраны интеллектуальной собственности селекционеров могут быть использованы различные методы различения и идентификации генотипов растений

В настоящее время в странах, входящих в Международный союз по защите новых сортов растений (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV), в том числе России для регистрации сорта используют критерии новизны, отличимости, однородности и стабильности (DUS) [15].

Отличимость (ведущий компонент DUS) оценивают как явное качественное отличие нового сорта от уже существующего хотя бы по одному признаку. Новый сорт должен быть достаточно однородным по своим морфологическим, цитологическим, химическим и другим признакам с учётом отдельных отклонений, которые могут иметь место в связи с особенностями размножения, но внутрисортная изменчивость новой формы не должна быть выше, чем у зарегистрированных сортов. Стабильность предполагает, что признаки сорта остаются неизменными после неоднократного размножения.

Оценку DUS проводят на основе обязательных, рекомендуемых и вспомогательных критериев:

1. Количественные морфологические характеристики (высота растения, форма листа)
2. Физиологические признаки (устойчивость к болезням и вредителям)
3. Биохимические характеристики (по запасным белкам) - относят к вспомогательным.

В связи с постоянным снижением сортовых качеств семян, необходим постоянный контроль за их сортовой чистотой.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Общая характеристика методов сортового контроля

Система семеноводства предусматривает постоянный контроль качества производимых семян, охватывающий процессы их выращивания, послеуборочной обработки, заготовки, хранения, реализации и использования. Сортовой контроль – система мероприятий по определению сортовой чистоты и установлению принадлежности сельскохозяйственных растений и семян к определенному сорту [16, 17].

Известно, что высокие урожаи и качественную продукцию можно получать только от семян высокой сортовой чистоты и первоклассных посевных качеств. Оценку качества семян на чистосортность у самоопыляющихся культур и на типичность у перекрестников проводят разными способами, в числе которых апробация посевов, грунтовой и лабораторный сортовой контроль

2.2. Апробация

Это наиболее распространенный метод. О подлинности и сортовой чистоте семян судят по морфологическим признакам растений в поле с дополнительным анализом апробационного снопа в лаборатории. Задача апробации – определение пригодности сортовых и гибридных посевов для использования в качестве семенных. Она устанавливает достоверность размножаемого сорта, определяет его сортовую чистоту и степень поражения посевов болезнями и вредителями.

Апробация проводится семенными инспекциями по специальной инструкции по заявкам производителей семян. При необходимости привлекаются и оригинаторы сортов. Ежегодной апробации подвергаются все сортовые посевы для реализации, посевы самоопыленных линий и участки гибридизации для получения простых гибридов. Проведение апробации возможно только при наличии документов: «Сортовое удостоверение» или «Свидетельство на семена» или «Аттестат на семена» или «Справка о выявлении местного сорта». После апробации оформляется «Акт апробации» или «Акт выбраковки»[8].

Для апробации каждой культуры инструкцией установлены определенные показатели (например, для ячменя)

•предельная площадь отбора одного снопа, га	450
•фаза развития растений на момент проведения анализа	начало восковой спелости
•число пунктов для взятия апробационных растений	150
•количество апробируемых стеблей со всей площади, не менее	1500
•нормы пространственной изоляции	-----

Недостатки этого метода в том, что не всегда удается учесть и правильно оценить все характерные морфологические признаки сорта, а главное - регистрация состояния посевов проводится только к моменту уборки или цветения и многие признаки в течение роста и развития остаются незамеченными. В практике нередко случаи засорения семян при уборке, после обработки и даже при хранении. Тогда показатели сортовой чистоты семян, полученные при полевой апробации, могут не совпадать с фактически фиксируемыми после высева этих семян [7].

2.3. Лабораторный сортовой контроль

Это определение сортовой чистоты и подлинности сортовых семян путем проведения лабораторного анализа.

Лабораторному сортовому контролю подлежат элитные и репродукционные семена. С его помощью выявляют засорение семян, которое может происходить после апробации, во время уборки, транспортировки и хранения.

В настоящее время арсенал лабораторных методов сортового контроля сильно ограничен. Практически он начинается только с введением в него методов белковых маркеров. При наличии в документах на сорт или линию характеристики по белковым маркерам оценку его сводят к анализу двух случайных выборок по 50 семян. Число семян, не имеющих этих маркеров, определяет засоренность в (%) анализируемой партии.

В качестве одного из видов лабораторного анализа в течение длительного времени используют электрофорез в различных модификациях.

2.3.1. Общая характеристика электрофоретических методов

Успехи агропромышленного производства в значительной мере определяет внедрение новых высококачественных сортов и гибридов, имеющих сильные генетические различия от существующих. Но реализация их преимуществ возможна только при исключении механического и особенно генетического засорения в процессе семеноводства.

Морфологических признаков целого растения не всегда достаточно для надежной идентификации сорта. В практике нередко случаи засорения семян при уборке урожая, последующей обработке и хранении. Тогда показатели сортовой оценки семян, полученные при полевой апробации, могут не совпадать со значениями, фиксируемыми после высева этих семян. В этом случае необходима лабораторная оценка партий семян до посева во избежание затрат от высева засоренных семян.

Производство семян многих сельскохозяйственных культур сопряжено с трудностями по очистке от видовых примесей. В семенах твердой пшеницы крайне нежелательна примесь мягкой, т.к. в связи с её высоким коэффициентом размножения при репродуцировании сильно возрастает засоренность семян твердой пшеницы. В семенах овса наличие примеси овсюга служит основанием для запрета на использование такого посевного материала, а присутствие фатуоидов - промежуточных форм не вызывает увеличения засоренности.

Различение семян овсяга и фатуоидов по морфологическим признакам нередко бывает ошибочным и приводит к необоснованной браковке партий семян. Во всех случаях примесь может быть быстро обнаружена с помощью электрофоретических методов

Повышение урожайности зерновых культур зависит от целого ряда мероприятий, среди которых основную роль играют внедрение в производство наиболее продуктивных сортов и улучшение их семеноводства. Многие современные сорта зерновых культур – это сложные популяции с высокими пластичностью и адаптивностью, но их труднее сохранить в процессе семеноводства, так как большинство составляющих их биотипов, различаясь по биологическим свойствам, одинаковы по морфологическим признакам. В связи с этим, возникла необходимость внедрения новых подходов и методов семеноводства. Среди них перспективен метод электрофореза полиморфных белков, позволяющий идентифицировать морфологически неразличимые биотипы, выделять их и поддерживать исходный состав сорта в процессе семеноводства.

В настоящее время контроль с помощью морфологических и физиологических признаков необходимо дополнять использованием белковых маркеров.

Белок – первичный продукт гена и может маркировать не только ген, но и хромосому или геном, в которых он локализован, а также вид, сорт или линию, несущие этот ген. Как правило, маркерами вида служат отдельные белки, характерные только для данного вида. Сорта и линии могут маркироваться как индивидуальными белками, так и группами полипептидов сложного белка, называемыми «спектром белка» и рассматриваемыми как отпечатки пальцев сорта или линии.

Для анализа белков-маркеров используют электрофоретические, иммунохимические и хроматографические методы. Наиболее удобны как маркеры запасные белки, накапливающиеся в семенах в большом количестве. Они наиболее доступны для стандартизации и их видовая и сортовая специфичность выявляется с помощью простых вариантов электрофореза и иммунохимии.

В течение многих лет в большинстве научно-исследовательских и селекционных учреждениях страны белковые маркеры используют в селекционной работе и начинают применять в первичном семеноводстве.

Работы по сортовой идентификации и регистрации генофонда сельскохозяйственных культур с использованием белковых маркеров начаты в ВИРе в конце 60-х годов. Их первые итоги подкреплены авторским свидетельством (1) и поддержаны в 1975 г. Международным симпозиумом по генетическим ресурсам растений. Разработанные в ВИРе методы сортовой идентификации в 1980г. рекомендованы 19-м конгрессом ISTA(International Seed Testing Association) к использованию в семеноводстве и семенном контроле.

На протяжении нескольких лет отдел молекулярной биологии ВИРа участвовал в разработке стандартных арбитражных методов идентификации сортов электрофорезом белков семян, которые включены в Международные правила семенного контроля по ячменю, пшенице, райграсу, гороху и кукурузе, на подходе к включению овес, подсолнечник, рапс, хлопчатник, свекла [25].

В системе государственного сортоиспытания нашей страны методы использования белковых маркеров применяли для определения оригинальности, гомогенности и константности принятых на испытание и вновь районированных с 1982г. сортов пшеницы и ячменя, с 1988г. – других культур. Анализ осуществляли лаборатории Госкомиссии и ВИРа. С 1982г. ВИР по договору с Госкомиссией по сортоиспытанию регистрирует в виде белковых формул поступающие на испытание сорта многих культур для оценки их на ООС. В настоящее время электрофорез используется при оценке на чистоту партий семян, поступающих от госсеминарских и лабораторий НИИ.

В подходах использования белковых маркеров имеются существенные различия в идентификации сортов у самоопыляющихся и перекрёстноопыляемых сортов. Известно, что среди сортов-самоопылителей есть генетически однородные, у которых все растения и все семена характеризуются одинаковыми белковыми признаками (одним типом спектра запасных белков и одинаковым набором аллелей ферментов). Для регистрации такого сорта достаточно записи одного из белковых признаков, обычно это формула запасного белка.

Многие сорта самоопылителей гетерогенны, у них выявляется несколько биотипов с различными белковыми признаками (1сорт – 2-3 формулы). Как правило, число биотипов невелико, а их соотношение в сорте в отдельных условиях выращивания очень стабильно. Для таких сортов записывают белковые формулы всех биотипов и частоту их встречаемости.

Сорта-популяции различаются по составу биотипов. Достоверность различий между такими сортами определяют по критерию χ^2 , рассчитанному при попарном сравнении частот биотипов в стандартных выборках 100 семян. Анализ по белкам позволяет на семенах (на один вегетационный период раньше) определить потерю типичности сорта в результате переопыления или механического засорения. Белковые маркеры дают возможность своевременно обнаружить существенное изменение структуры популяций при неблагоприятных условиях выращивания, которое может привести к изменению характеристик сорта [34, 37, 38].

Оригинальность сорта оценивают сравнением с сортами, зарегистрированными ранее по этим признакам в каталогах сортовых белковых формул [26]. Если у сортов обнаружены идентичные формулы запасных белков, у них выявляются другие специфичные белковые признаки.

Некоторые сорта не имеют чётких морфологических различий и идентифицировать их можно только с помощью белковых признаков.

Наиболее эффективный путь идентификации сортов – изучение полиморфизма белков. Генетическая природа полиморфизма белков злаков наиболее изучена. На основе использования электрофоретических спектров проламинов создана целая серия способов идентификации сортов [10-14].

Многие районированные сорта могут иметь одинаковые формулы запасных белков. Это связано с различной адаптивной ценностью аллельных вариантов компонентов запасных белков, а также с вовлечением в селекционный процесс близкородственного материала.

При идентификации сортов необходимо дополнительно проводить анализ полиморфных белков, кодируемых другими локусами.

Идентификация видов, сортов, линий и биотипов необходима для точного и объективного определения видовой и сортовой принадлежности растения, создания совершенной номенклатуры видов и внутривидовых подразделений, а также для документации генофонда культурных растений и диких форм в целях учета, сохранения и эффективного их использования в селекции. Идентификация необходима в селекционном процессе для выявления и выделения желаемых генотипов из сложных естественных, сортовых и гибридных популяций. Но особенно она важна в семеноводстве в целях оперативного семенного контроля высокой точности.

2.3.2. Определение электрофореза

Электрофорез - метод, используемый для разделения заряженных частиц под влиянием электрического поля, основанный на различии их подвижности в растворе (свободный электрофорез) или в поддерживающих средах (зональный).

Электрофоретическое разделение всегда проводится в гелевых носителях (полиакриламидном и крахмальном гелях). Эти методы 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 - полиакриламидный или крахмальный гели имеют пористую структуру, в которой размер пор соизмерим с размерами белковых молекул. Поэтому в геле полипептиды с большей молекулярной массой будут двигаться медленнее в сравнении с полипептидами с меньшей молекулярной массой.

Таким образом, смесь белков может быть разделена на дискретные зоны в зависимости от заряда и размера их молекул. Проводя электрофоретическое разделение, необходимо визуализировать белки тем или иным способом, т.к. их нельзя увидеть непосредственно. Для этого используются различные методики окрашивания [28, 29].

Существует несколько различных приёмов электрофореза.

Совершенствование метода электрофореза должно быть направлено на повышение способности различения генотипов (но не на увеличение числа компонентов в спектре), а также на ускорение и упрощение процедуры анализа. В настоящее время это достигается оптимизацией буферных систем, состава геля и толщины пластин.

2.3.3. Выбор белков для сортовой идентификации.

Для эффективной работы по идентификации, определению сортовой чистоты и гибридности семян используемые белки должны отвечать следующим требованиям:

1) электрофореграммы используемых белков должны быть достаточно сортоспецифичны. Т.е. электрофоретические спектры белков большинства сортов должны хорошо различаться, а электрофореграммы белков гибридов должны четко отличаться от таковых родительских линий или форм. Это предполагает, с одной стороны, наличие нескольких генов или локусов, контролирующих белки, а, с другой стороны, множественный аллелизм этих генов или локусов.

2) Электрофореграммы белков не должны зависеть от условий, места выращивания, длительности и условий хранения семян.

3) Методика электрофоретического анализа должна быть быстрой, достаточно производительной и дешевой для проведения массовых анализов.

Этим требованиям наиболее полно у зерновых культур отвечают спирторастворимые запасные белки эндосперма - проламины (глиадины пшеницы, гордеины ячменя, зеины кукурузы, авенины овса). Проламины чрезвычайно разнообразны и обладают сортоспецифичностью (достаточно сказать, что, например, по электрофореграммам глиадинов различаются более 90% сортов пшеницы и около 80% сортов ячменя). Электрофоретические спектры этих белков не зависят ни от условий выращивания растений, ни от условий и длительности хранения. Эти белки появляются в эндосперме на 11-й день после оплодотворения и сохраняются минимум в течение 3-х суток после прорастания зерновки. Электрофореграммы глиадина можно получить даже из выпеченного хлеба или макаронных изделий.

Для сортовой идентификации могут использоваться и ферментные белки. Однако подавляющее большинство из них имеет ограниченный полиморфизм. Недостаток полиморфизма можно в определенной мере компенсировать большим количеством изучаемых генов или локусов, контролирующих различные ферменты.

Определение сортовой чистоты семян методом электрофоретического анализа

Идентификацию сортов электрофоретическим методом проводят анализом единичных зерен с растений или в случайной выборке из партии семян. Для сортов самоопыляющихся культур выборка составляет 100 семян. Очень точное определение сортовой чистоты или детальный анализ на биотипный состав сложного сорта могут потребовать анализа 2-3 выборок. Для простого определения идентичности партий семян или оценки образца на сортовую принадлежность достаточна выборка из 50 семян и меньше.

2.3.4. Целесообразность использования электрофореза

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 или популяции является сравнением изменений в экспрессии генов. Изучая достаточное количество маркеров, можно охватить большую часть генома. Т.к. генотипы сортов сельскохозяйственных культур

различаются по аллелям генов, сравнение состава определенных белков или ферментов 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. Существуют 4 типа белков, но наиболее пригодными для идентификации сортов являются запасные белки. Почти у всех видов 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 оказывается пригодным для идентификации сортов и гибридов.

В качестве альтернативного метода использование специфических красителей может выявить множественные молекулярные формы определенных ферментов (изозимов). Как и запасные белки, они напрямую экстрагируются из тканей. Генетический контроль многих ферментов хорошо изучен. Таким образом, нет недостатка в удобных белковых маркерах, встречаемых в большинстве сельскохозяйственных культур, будь это белки семян или изоферменты из различных тканей растений.

2.3.5. Рекомендуемые методы электрофоретического анализа запасных белков

Опубликовано по крайней мере 27 методов по идентификации сортов пшеницы с помощью электрофореза белков и только немногим меньше для ячменя. Большинство из этих методов включает разделение глиадинов и гордеинов при кислом pH, используя полиакриламидный гель. Это в основном разновидности методик электрофореза в крахмальном геле, которые были первыми эффективными методиками анализа для идентификации сортов пшеницы и ячменя и очень широко использовались в Европе и Австралии (9,22-24,34).

Методика должна обеспечивать воспроизводимость, максимальное выявление различий между сортами или родительскими линиями гибридов, быть максимально быстрой, дешевой, удобной - предусматривать использование по возможности меньше манипуляций; приборов, таких как центрифуги, криостаты, а также ядовитых и зловонных реактивов.

Важнейшим элементом методики является система регистрации и интерпритации результатов электрофореза. Система регистрации должна быть простой, надежной и объективной.

Остановимся на сравнении трех основных методик электрофоретического анализа запасных белков ячменя.

Первая из них - методика, предлагаемая ISTA, вторая - разработанная и используемая во Всероссийском институте растениеводства им. Н.И.Вавилова

(ВИР), третья - разработанная в Селекционно-генетическом институте (Одесса) и с некоторыми модификациями используемая в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен).

2.3.6. Методические особенности проведения электрофоретического анализа.

Методики ISTA и ВИР основаны на использовании полиакриламидного геля (ПААГ) в концентрации 10% и 6% соответственно; применяемая в ИОГен методика - на использовании крахмального геля. Отметим, что акриламид является токсичным веществом. Даже его 1%-ный раствор может вызвать раздражение кожи. Акриламид действует так же на центральную нервную систему. Поэтому, работая с акриламидом и гелями на его основе, необходимо соблюдать осторожность и пользоваться резиновыми перчатками.

Метод ISTA предлагает использовать для экстракции гордеинов смесь 2-хлорэтанола, мочевины и 1%-ного β -меркаптоэтанола - ядовитого и зловонного препарата, требующего очень аккуратной работы и герметичности пробирок с пробамии. 2-хлорэтанол так же является ядовитым веществом (ПДК 0,5мг/м³); стоимость - более 70 долларов США за 1л. Метод ВИР в качестве экстрагирующего агента предлагает использовать 6М мочевины, метод ИОГен - 70%-ный этанол. Сравнение некоторых условий электрофореза трех указанных методик приведены в табл. 1.

Таблица 1. Сравнение некоторых условий электрофореза гордеинов ячменя по методикам ISTA и ИОГен

Условия	ISTA	ИОГен
Гель	ПААГ*	Гидролизированный картофельный крахмал
Форма геля	Пластина	Столбики (в трубках)
Буфер	Глицин-ацетатный (pH3,2)	Алюминий-лактатный (pH3,2)
Экстрагирующий раствор	20% 2-хлор этанол* 18% мочевины 1% β -меркаптоэтанол*	70% этанол
Центрифугирование	18000 x g	Не требуется
Охлаждение электродного буфера при электрофорезе	Требуется 15 -20°C	Не требуется
Напряжение при электрофорезе (v)	500	350
Время электрофореза, часы	5	2
Время от постановки электрофореза до получения результата	3 суток	6 часов
Количество проб в одном приборе	30	40
Включение стандарта в каждый опыт	Требуется	Не требуется
Концентрация ТХУ* в фиксирующем растворе	10%	5%

* ядовитые реактивы

Подготовка зерен к анализу по методике ISTA заключается в разрушении зерновки плоскогубцами или подобным образом. Метод ВИР предполагает взвешивание каждой зерновки для расчета добавляемого экстрагента с предварительным удалением пленок, а затем тщательного растирания в ступке. Метод ИОГен предусматривает предварительное замачивание зерен в 1,5%-ном растворе фенола на ночь при температуре 38°C, снятие пленок с помощью пинцета (пленки отделяются очень легко) и дальнейшее разрушение мягкого эндосперма в спирте с помощью палочки из стекла или нержавеющей стали. Во всех случаях экстракция идет ночь. По методике ISTA и ИОГен - при комнатной температуре, по методике ВИР - при +4°C.

Стоимость анализов (по ценам только основных реактивов) по методикам ISTA и ВИР в 3 - 4 раза дороже по сравнению со стоимостью анализов по методике ИОГен.

2.3.7. Использование электрофореза

а) Дифференциация сортов.

Одной из основных характеристик методики электрофоретического анализа является ее способность дифференцировать сорта. Сравним косвенно различные методы электрофореза по этому показателю. В описании методики ISTA отмечается, что анализ 350 коллекционных сортов ячменя разделил их по электрофореграммам на 67 групп. Анализ по методике ИОГен 228 сортов ячменя, районированных на территории бывшего СССР, разделил их по спектрам гордеинов на 113 групп. Согласно результатам исследований по методике ISTA, гетерогенными (т.е. состоящими из 2-х или более биотипов, различающихся по электрофореграммам гордеинов) являются 10% сортов. По данным ИОГен, полученным при анализе 619 сортов мировой коллекции и 228 сортов бывшего СССР, таких сортов около 30%.

Оценка дифференцирующей способности методики электрофореза гордеинов по результатам анализа 78 современных сортов ячменя в 12 регионах РФ представлена в таблице 2. Как видно из таблицы, лишь в Северо-Кавказском и Нижневолжском регионах методом электрофореза различимы 69,0 и 57,0% сортов. В остальных регионах доля различающихся по спектрам гордеинов сортов составляет от 77 до 100%.

Таблица 2. Дифференциация сортов ярового ячменя, районированных в регионах РФ путем электрофоретического анализа гордеинов по методике ИОГен.

Регионы	Число сортов	Доля дифференцируемых сортов, %
1. Северный	7	100,0
2. Северо-Западный	16	81,3
3. Центральный	14	85,7
4. Волго-Вятский	14	78,6
5. Центрально-Черноземный	10	90,0
6. Северо-Кавказский	13	69,0
7. Средневолжский	17	76,5
8. Нижневолжский	14	57,0

9. Уральский	16	87,5
10. Западно-Сибирский	17	82,3
11. Восточно-Сибирский	17	88,2
12. Дальневосточный	9	77,8

б) Маркирование инбредных линий и определение гибридности

Инбредные линии используются при создании высокопродуктивных гетерозисных гибридов. Для осуществления контроля за чистотой линий, установления их оригинальности, и особенно определения гибридности семян первого поколения недостаточно морфологических признаков.

Для оценки на генетическую однородность проводят анализ индивидуальных семян – 2 выборки по 50 шт. У генетически чистой линии все семена выборки дают один тип спектра запасного белка или имеют одинаковые другие белковые признаки. Наличие в небольших количествах (до 2%) семян с другими типами спектра свидетельствует о биологическом (в результате переопыления) или механическом засорении линии. При обнаружении в образце двух или более равноценных по частоте встречаемости типов спектра белков делается вывод об отсутствии линии как таковой. Это смесь линий или простого межлинейного гибрида с его материнской линией. Возможно, что инбридинг с самого начала не был обеспечен надежным критерием отбора.

Часто отбору недоступны морфологически неразличимые генотипы. В таких случаях с помощью белковых маркеров можно ускорить процесс гомозиготизации линий. Для этого анализ белкового признака проводят на небольшой части эндосперма или семядоли, сохраняя жизнеспособность семян. При посеве используют лишь семена со специфичным для линии белковым признаком.

Поэтому для описания линии используют только один белковый признак, который служит для её регистрации и установления оригинальности. Все широко используемые инбредные линии кукурузы и подсолнечника имеют специфичные типы спектра запасного белка (зеина и 11S глобулина).

в) Создание базы данных генетических формул гордеинов районированных сортов

Другое преимущество, которое дает генетический подход в анализе электрофореграмм гордеинов - создание базы данных для последующего анализа распространения аллелей гордеинкодирующих локусов у сортов на территории РФ. Ни одна европейская страна, как и вся Европа, не имеют такого разнообразия климатических условий как Россия. Вместе с тем показано, что распределение аллелей гордеиновых локусов на территории бывшего СССР на 70% обусловлено распределением осадков, температурного режима в период вегетации и континентальностью климата. Создание и анализ такой базы данных позволил бы оптимизировать сортоиспытание и районирование новых сортов.

г) Применение электрофореза белков в первичном семеноводстве зерновых культур

Белковые маркеры полезны при решении вопросов о том, какие отклоняющиеся морфологические признаки следует учитывать для признания растений нетипичными. Они могут быть рекомендованы на следующих этапах семеноводства:

1. При первичном отборе лучших растений для передачи в питомники испытания- проводят анализ нескольких семян с каждого растения для проверки их типичности и отсутствия переопыления (у перекрестников). При размножении сорта, состоящего из нескольких биотипов, необходимо при отборе стремиться сохранить состав и соотношение этих биотипов. Для особенно ценных сортов необходимо отдельное выращивание каждого биотипа.

2. В питомниках испытания потомств необходим контроль на присутствие отклоняющихся типов растений. С помощью электрофореза легко определить причину появления растений с отклоняющимися признаками.

За последнее время наибольшие успехи по выявлению внутрисортного полиморфизма достигнуты в результате применения запасных белков в полиакриламидном и крахмальном гелях. В мировой практике метод электрофоретического анализа белков включен в Международные правила семенного контроля в качестве объективного способа установления подлинности, стабильности и чистоты сорта.

В России много спорили о введении этого метода в систему государственного сортоиспытания, и сейчас, к сожалению его относят к вспомогательным. Его применяют для установления оригинальности, гомогенности и константности принятых на испытание районированных сортов ячменя и пшеницы только при желании организаций, участвующих в размножении семян.

Возможность использования полиморфных белковых систем в качестве маркеров позволяет проводить отбор элитных растений и потомств с учётом их генетической разнокачественности, обращая внимание не только на морфологические признаки сорта, подверженные широкой изменчивости под влиянием внешних условий.

Особенность метода электрофоретического анализа в том, что он дает возможность работать не только с фенотипом, но и с генотипом растений. Это позволяет избежать ошибок, вызванных модификационной изменчивостью, так как спектр белков остается стабильным независимо от условий окружающей среды.

Выявление генетической внутрисортной изменчивости у сортов самоопыляющихся культур на основе электрофореза запасных белков дает возможность поддерживать сорта в чистоте, сохраняя их генетический полиморфизм.

Следует учитывать, что новые методы сортовой идентификации зерновых культур несколько не снижают значение других полевых и лабораторных методов идентификации сортов, а служат ценным дополнением к ним.

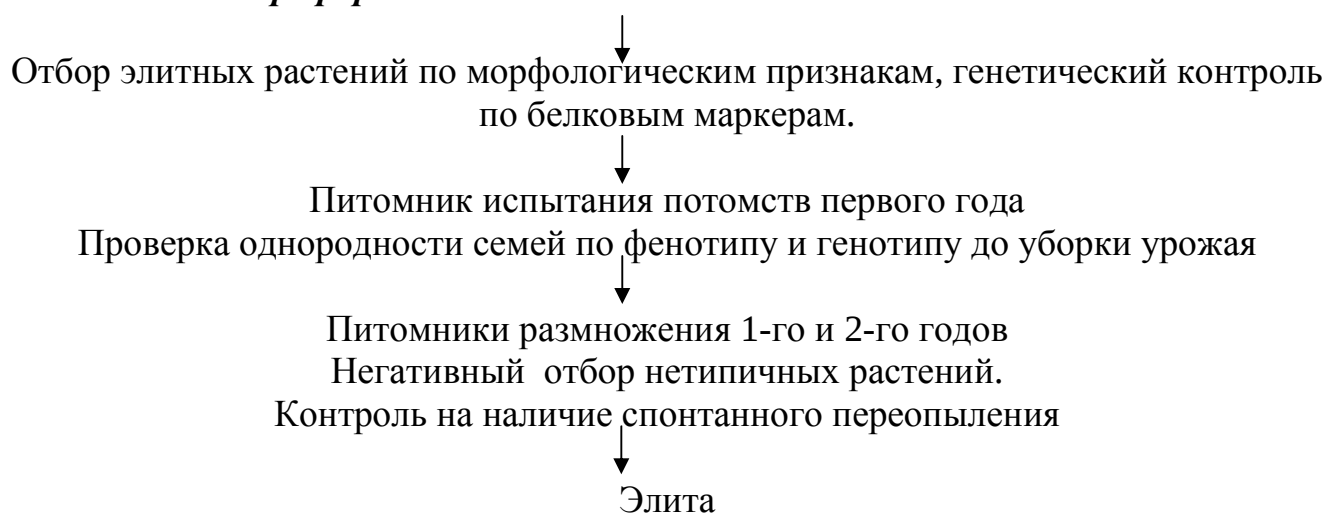
2.3.8. Эффективность применения электрофореза при выращивании элиты самоопыляющихся культур.

При интенсивном земледелии сортосмена должна осуществляться через четыре-пять лет. Для этого необходимо быстрое размножение семян новых районированных сортов с сохранением их чистоты и всех ценных хозяйственно-биологических свойств и признаков сорта.

Используя электрофоретический анализ семян можно оценивать по генотипу каждое отобранное растение для питомников испытания потомств 1 года и устанавливать его принадлежность к конкретному биотипу раньше получения результатов по потомству. Кроме того, морфологически ценные признаки и свойства, по которым ведут оценку и отбор растений сильно модифицируются, а это затрудняет выявление наследственных изменений, по которым необходимо проводить жесткую браковку.

При использовании в первичном семеноводстве метода индивидуального отбора, когда у каждого родительского растения проводят двухлетнее испытание по потомству, предусматривается создание более качественной элиты по сравнению с массовым отбором, но на это уходит 7 лет. Метод электрофоретического анализа семян позволяет, не снижая качества, сократить срок создания элиты на два года:

Схема выращивания элитных семян зерновых культур с использованием в ее звеньях электрофоретического анализа запасных белков.



2.3.9. Система регистрации и интерпретация результатов электрофореза.

В интерпретации и регистрации (записи) электрофоретических спектров белков существует два принципиально различных подхода.

Первый основан на определении относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) каждого белкового компонента на электрофоретическом спектре анализируемого образца относительно или отдельных "маркерных" компонентов какого-либо стандартного сорта, или относительно компонентов "эталонного" спектра, полученного при электрофорезе смеси белков сортов различных культур.

Второй подход основан на знании наследования и генетического контроля гордеинов и заключается в простом визуальном сравнении типов совместно наследуемых компонентов (блоков компонентов) гордеинов или с эталонным спектром (спектрами) данного сорта или с каталогом типов блоков компонентов. ISTA предлагает использовать в качестве стандарта при записи и интерпретации электрофореграмм анализируемых сортов спектр гордеина сорта Atem. Этот стандарт должен присутствовать в каждом опыте (в каждой пластине геля при электрофорезе). Затем рассчитывать ОЭП "наиболее четких компонентов" анализируемых образцов относительно маркерных компонентов стандарта (см.рис.1)

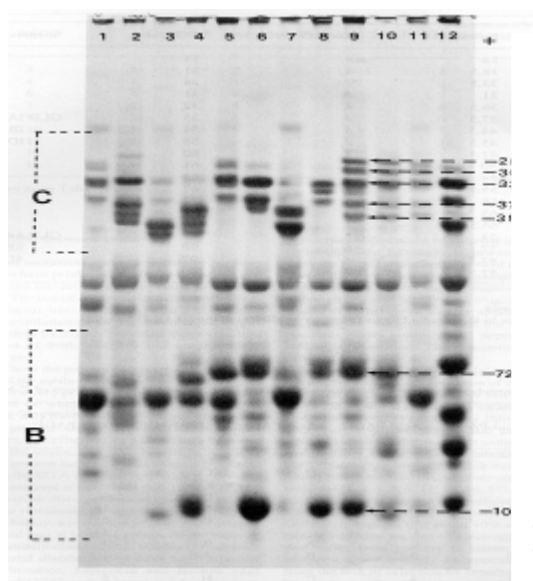


Рис.1

Во-первых, определение "четких" и "нечетких" компонентов вносит элемент субъективизма, что может привести к расхождению результатов, получаемых в различных лабораториях и в разное время. Во-вторых, в результирующей формуле электрофореграммы необходимо указывать ОЭП всех регистрируемых компонентов. Это делает формулу громоздкой, т.к. она может включать до 20-ти цифр.

ВИР предлагает использовать для записи электрофореграмм эталонный спектр, полученный при электрофорезе смеси глиадинов пшеницы, гордеинов ячменя и авенинов овса. Эталонный спектр разделен на зоны α , β , γ , ω и в каждой зоне компоненты пронумерованы. Задача состоит в том, чтобы анализируемые спектры сравнить с эталонным, указать номера совпадающих компонентов, а также отметить их большую или меньшую интенсивность черточками сверху или снизу номеров, указать цифровым индексом смещение сравниваемого компонента относительно стандартного.

Для оценки интенсивности полипептидов ВИР использует 3-х балльную шкалу:

- 1- слабый компонент
- 2- средней интенсивности
- 3- интенсивный

Типы спектра - I-VII.

Состав и интенсивность полипептидов гордеина, балл – $\alpha, \beta, \gamma, \omega$.

На рис. 2 представлен пример такой записи. При этом также получается громоздкая формула, отягощенная еще и дополнительными обозначениями.

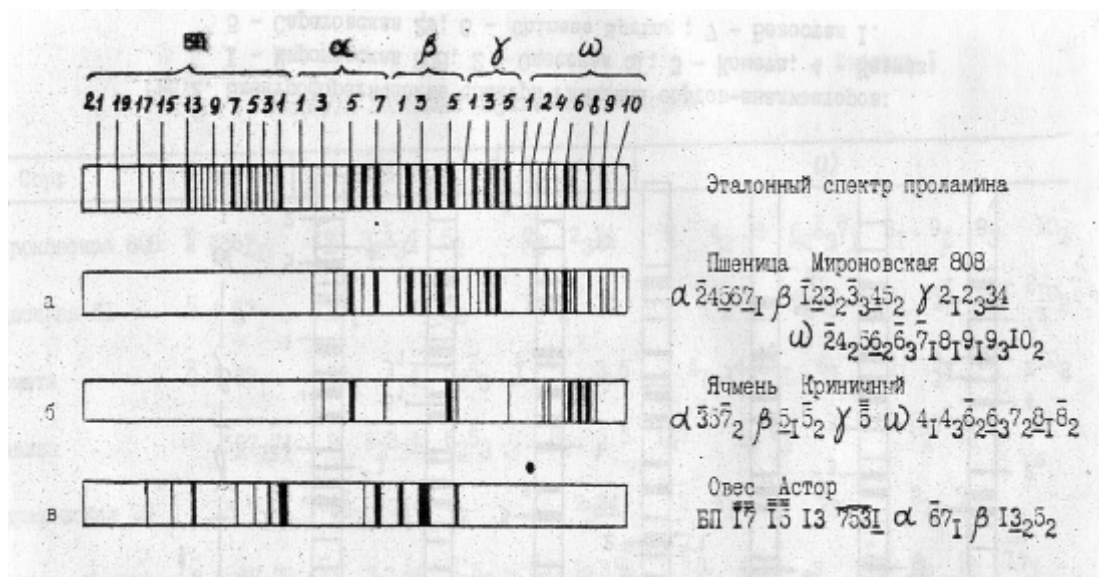
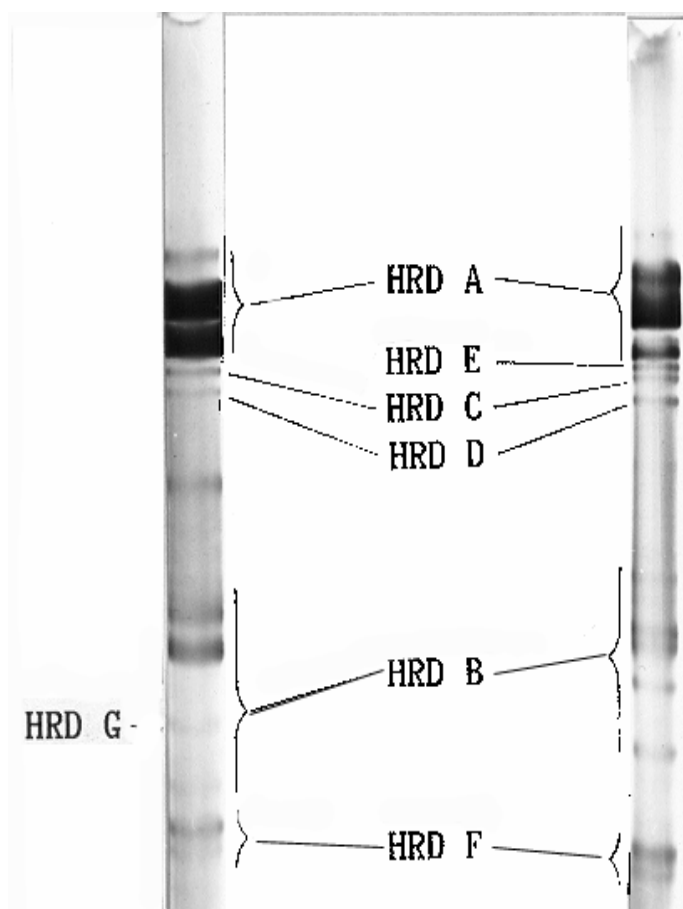


Рис. 2 Запись спектров глиаина пшеницы (а), гордеина ячменя (б) и авенина овса (в) в виде белковых формул по эталонному спектру проламина.

ИОГен предлагает генетический подход, резко упрощающий анализ и регистрацию электрофореграмм. В этом случае не требуется ни стандартный сорт, ни эталонный (типа предлагаемого ВИР) спектр и не нужно измерять ОЭП каждого компонента. Многочисленными исследованиями, выполненными еще в 70-х - 80-х годах в нашей стране и за рубежом показано, что компоненты гордеина наследуются группами (блоками) и контролируются несколькими кластерами (локусами) тесно сцепленных и не рекомбинирующих между собой генов. Таким образом, блок компонентов является менделирующей единицей (его наследование подчиняется законам Менделя при моногенном наследовании). Всего известно 7 таких локусов, обозначаемых как Hrd A - Hrd G. Три из этих локусов (Hrd A, Hrd B и Hrd F) очень полиморфны и имеют десятки аллелей. Остальные четыре локуса контролируют присутствие или отсутствие отдельных компонентов. Блоки компонентов, контролируемые локусами Hrd A, Hrd B и Hrd F на электрофоретическом спектре разделены пространственно (рис.3). Аллельные блоки компонентов гордеинов

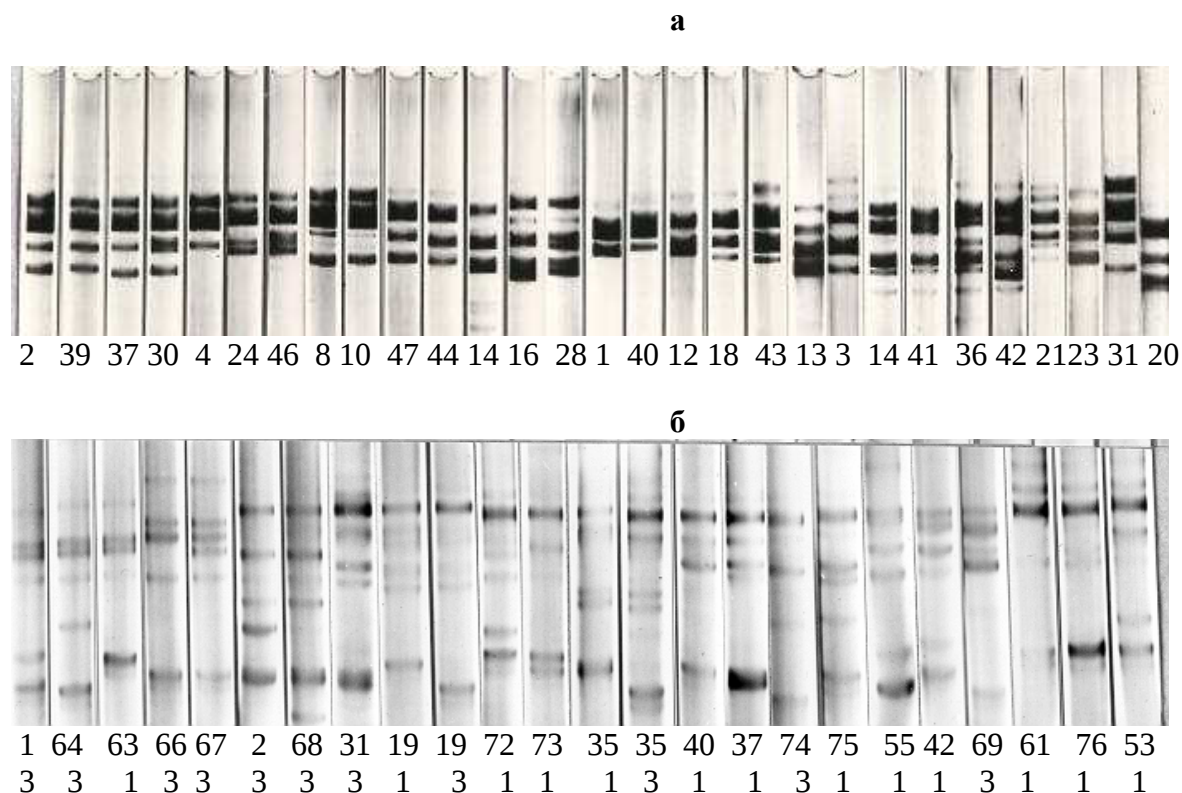
Рисунок 3. Генетический контроль электрофоретических компонентов гордеина и способ записи электрофореграмм в виде генетических формул



Цифровые обозначения аллелей локусов (блоков компонентов) различаются по количеству, подвижности и интенсивности компонентов. Каждому варианту блока присвоен свой номер (в порядке обнаружения). Таким образом, спектр гордеина любого сорта записывается в виде простой генетической формулы, как это показано на рисунке. Пользуясь уже имеющимися каталогами аллельных блоков компонентов, контролируемых локусами Hrd A, Hrd B и Hrd F (рис. 5),

можно регистрировать электрофореграммы сортов, определять в целом ряде случаев и сорт-примесь, если это будет иметь место в исследуемых семенах.

Рис. 4. Пример каталогов: а - по блокам компонентов, контролируемых аллелями локуса



а-Hrd A (цифрами обозначены номера блоков); б - по блокам компонентов, контролируемых аллелями локуса Hrd B (цифры в верхней строке) и Hrd F (цифры во второй строке); блоки компонентов гордеинов F различаются по подвижности.

Имея формулу гордеина какого-либо сорта и каталог типов блоков компонентов, можно легко представить себе спектр гордеина этого сорта. Генетический подход позволяет четко различать гетерогенность сорта, возникшую в результате отбора гетерозиготного по гордеиновым локусам растения и неоднородность сорта по вариантам гордеинов, возникшую в результате засорения.

Примером может служить сорт озимого ячменя Одесский 46, имеющий 8 биотипов, различающихся по компонентному составу гордеина. Как видно из рисунка, у биотипов сорта Одесский 46 присутствуют два аллеля по локусу Hrd A (Hrd A1 и Hrd A3), два аллеля по локусу Hrd B (Hrd B6 и Hrd B10) и два аллеля по локусу.

Учитывая стоимость анализов, их производительность и скорость, а так же способы интерпретации и регистрации электрофореграмм и применение вредных реактивов, из трех основных рассмотренных здесь методов к использованию в

лабораторном контроле сортовой принадлежности и сортовой чистоты семян ячменя рекомендуется метод электрофореза в крахмальном геле ИОГен.

Другое преимущество, которое дает генетический подход в анализе электрофореграмм гордеинов - создание базы данных для последующего анализа распространения аллелей гордеинкодирующих локусов у сортов на территории РФ. Ни одна европейская страна, как и вся Европа, не имеют такого разнообразия климатических условий как Россия. Вместе с тем показано, что распределение аллелей гордеиновых локусов на территории бывшего СССР на 70% обусловлено распределением осадков, температурного режима в период вегетации и континентальностью климата. Создание и анализ такой базы данных позволил бы оптимизировать сортоиспытание и районирование новых сортов.

2.4. Грунтовой сортовой контроль

2.4.1. Особенности грунтового контроля в системе сертификации семян

Грунтовой контроль - это установление принадлежности семян сельскохозяйственных растений к тому или иному сорту и определение их сортовой чистоты с помощью посева на специальных участках и непрерывного наблюдения за сортовыми признаками. Наблюдение ведется в течение всей вегетации – от стадии всходов до наступления уборочной спелости. Например, у ярового ячменя 33 сортовых признака, и у каждого сорта есть только свое, уникальное сочетание их. На этом основан принцип отличия сортов с помощью грунтового контроля.

Каждый признак оценивается в определенную стадию развития по специальной шкале (у каждой культуры своя) по нескольким градациям (напр. от 1 – очень слабой степени проявления признака до 9 – очень сильной).

Грунт-контроль проверяет подлинность и чистоту сорта на различных этапах его размножения – суперэлиты, элиты, репродукций и самоопылённых линий кукурузы (18-21,31,35).

Особенности грунтового контроля состоят в том, что при его проведении на поле одновременно представлены деланки стандартного образца, оригинальных семян, суперэлиты, элиты и репродукционных семян.

Грунтовой контроль используется для:

1. Определения соответствия образца из партии семян официальному описанию сорта при его регистрации, подтверждающего его сортовую подлинность;

2. Визуального сравнения сортовых признаков растений, выросших на деланке из отобранного образца партии семян, с растениями, выросшими на этом же участке из стандартного образца. Однако, в некоторых случаях, это может быть недостаточным для того, чтобы сделать выводы – требуется более детальное сравнение сортовых признаков. Например, для многих видов трав испытания рекомендуется проводить в широкорядных посевах, которые позволяют осуществлять объективную оценку отдельных показателей и проводить соответствующий статистический анализ.

Для определения подлинности сорта путем визуального сравнения и установления нетипичных растений рекомендуется располагать деланки на контрольном участке так, чтобы все образцы одного сорта располагались рядом. Образцы семян партий одного поколения внутри каждого сорта также желательно располагать рядом. В этом случае деланки с нетипичными растениями более наглядны и удобны для наблюдения. Если же требуется проведение каких-либо статистических расчетов, это условие может не выполняться.

3. Выявления соответствия образца из партии семян заявленным стандартам сортовой чистоты. Необходимо установление количества нетипичных растений на контрольной деланке для сравнения с принятыми стандартами сортовой чистоты. Эти стандарты обычно выражают процентное соотношение нетипичных растений в популяции, или их количество на единицу площади. Данный тест позволяет определить степень однородности партии семян, а также, динамику изменения сортовых характеристик в процессе воспроизводства. Кроме того, это позволяет рекомендовать количество поколений семян для размножения в конкретных производственных условиях.

Независимо от культуры, испытываемой на участке грунтового контроля, используется метод сравнения сортовой чистоты проб, взятых на разных этапах производства семян со «стандартным образцом» данного сорта. Проведение испытаний должно быть организовано таким образом, чтобы полученная информация была максимально объективной для установления соответствия партии семян по сортовой чистоте требованиям схемы сертификации OECD.

Стандартные образцы предназначены для составления точного описания сорта в ходе государственного испытания. Эта информация является наиболее надежным источником, на основе которого оцениваются образцы семян в процессе сертификации. Семена и растения, которые выращены из них, не должны существенно отличаться по всем характеристикам от полученных в ходе государственного испытания, на основе которых дается заключение о регистрации сорта. Некоторые категории растений требуют наличия нескольких стандартных образцов для разных поколений (например, гибриды). Стандартный образец по требованиям OECD получают в органе, ответственном за регистрацию сортов. В России таким органом является Государственная комиссия по испытанию и охране селекционных достижений (Госсорткомиссия)[3].

Стандартный образец сдается в Госсорткомиссию при оформлении заявки по сортоиспытанию на отличимость, однородность, стабильность (ООС). Образец семян хранится там же в условиях минимального снижения всхожести. Обычно запаса семян от одного стандартного образца хватает на 5 лет, после чего оригинатор сорта его возобновляет. В качестве альтернативного варианта получения стандартной пробы, особенно если требуется большое ее количество, разрешается использовать образец из оригинальных семян, полученный непосредственно у оригинатора сорта. При этом допустимо сравнение растений из такого образца по признакам ООС со стандартным образцом, находящимся в Госсорткомиссии.

Если сорт происходит из другой страны, то соответствующему регистрационному органу этой страны вносится предложение сообщить о рекомендуемом источнике получения стандартного образца.

Стандартный образец должен быть достаточно большим (чтобы хватило на несколько лет). Его необходимо хранить в условиях, обеспечивающих максимальное сохранение всхожести. Если всхожесть стандартного образца снижается или запас семян требует пополнения, необходимо заблаговременное его обновление. При этом требуется проведение сравнительного анализа в полевых испытаниях нового и старого образцов, чтобы проверить подлинность нового до того, как предыдущий закончится.

Средние образцы для грунтового контроля отбирают с соблюдением действующих стандартов от окончательно подготовленных партий семян, имеющих сортовые документы. Отбор производится комиссией в составе представителя контролирующего органа, руководителя или агронома хозяйства и кладовщика. Отбор средних образцов оформляется Актом отбора средних образцов, который составляется в двух экземплярах. Образцы семян упаковывают в мешочки из плотной ткани, в которые вкладывают этикетку с перечисленными в акте данными, вторая этикетка наклеивается на поверхность мешочка. Образцы пломбируются пломбами или печатями контролирующего органа и производителя семян. Вместе с образцом и актом отбора проб берутся копии сортовых документов. Один экземпляр акта остается у производителя семян, другой, вместе с двумя апломбированными образцами отправляется на участок грунтового сортового контроля.

На участке грунтового контроля поступившие семена регистрируются в журнале регистрации образцов. Регистрационный номер проставляют на мешочках двух образцов и на документах, их сопровождающих. Документы подшиваются в папку в порядке регистрации номеров.

Один из двух образцов анализируют на подлинность в соответствии с действующими методиками. Если примесь семян в образце будет выше нормы, то такие семена не высеваются, а партия выбраковывается. Второй образец хранится до урожая следующего года на случай возникновения спорных вопросов.

В соответствии с законом “О селекционных достижениях” сорт подлежит регистрации, если он удовлетворяет требованиям отличимости, однородности и стабильности - способности сохранять свои признаки в течение определенного периода времени. Сорт должен сохранять свои признаки при пересеве и иметь неповторимое название, закрепленное соответствующими документами.

Грунт-контроль подтверждает неизменность свойств и признаков сорта в процессе воспроизводства семян. Его введение было необходимо для вступления России в 2002г. в Организацию экономического сотрудничества и развития (OECD), при этом Россия получила право на выдачу международного сертификата OECD на сортовые качества семян. Это облегчило торговлю семенами между странами, а также дало возможность пользоваться услугами международного арбитража [2].

Грунтовой контроль является составляющим звеном сортового контроля и используется для проверки:

- оригинальных семян
- элиты
- самоопыленных линий кукурузы

Этим методом иногда проверяют оригинальные семена, репродукции простые гибриды кукурузы для межлинейных скрещиваний.

2.4.2. Технологические требования при проведении грунтового контроля

При выборе места для расположения контрольного участка необходимо следить за тем, чтобы была устранена возможность переопыления или технологического засорения примесью тех же или близких культур. Это обеспечивается тщательным изучением истории полей, продуманным севооборотом, соблюдением норм пространственной изоляции, выбором оптимальной технологии обработки почвы, анализом результатов апробации предыдущих посевов на данном участке и подбором оборудования и техники.

Перед посевом составляется рабочий план посева образцов семян. В нем по каждому образцу указывается, согласно записи в журнале, культура, сорт, номер образца, название производителя семян. Контрольные участки для испытаний должны быть разбиты таким образом, чтобы было легко проводить все наблюдения. Земельная площадь, на которой размещены семеноводческие посевы, не должна быть занята в предыдущем году аналогичными культурами. Целесообразно выбирать наиболее выровненные по плодородию поля для получения быстрых и ровных всходов.

Схема размещения контрольных делянок на выбранном участке зависит от используемой сельскохозяйственной техники. Главное условие – обеспечить возможность сравнения испытуемых образцов со стандартным. Предпочтительно такое размещение делянок, при котором все образцы одного и того же сорта сгруппированы вместе. Этим облегчается проведение их сравнительного анализа со стандартным образцом. Морфологически похожие сорта также размещаются в непосредственной близости друг от друга, чтобы облегчить обнаружение незначительных различий между ними.

Внутри одного сорта сравнение признаков упрощается, если образцы семян одного происхождения высеваются на соседних делянках. В этом случае, при выявлении примеси на одном участке, можно сразу же обследовать соседний участок на их присутствие. Если материальные ресурсы позволяют, для получения более точных результатов рекомендуется дублировать посевы в другой части поля.

При необходимости проведения каких-либо статистических расчетов, можно прибегнуть к более сложной схеме размещения делянок, например, к разбивке их на блоки. Для некоторых видов трав и кормовых бобовых целесообразно использовать схему разреженного посева на контрольных делянках, что позволяет точнее определять типичные морфологические признаки на отдельных растениях.

Технология возделывания на участках грунтового контроля, как правило, не отличается от применяемой в производственных целях для соответствующих культур. Разница лишь в том, что условия на контрольных участках должны позволять изучение и наблюдение за растениями на всех важных фазах их развития. Иногда требуется свести уровень применения удобрений до минимума, чтобы избежать полегания, особенно у злаковых культур. Необходимо также соблюдать осторожность в использовании гербицидов и регуляторов роста растений, которые могут повлиять на морфологию растений. Системы сельскохозяйственных машин и оборудования могут быть обычными из ассортимента, применяемого в семеноводческой работе. Очистку сеялки и засыпку семян проводят за пределами контрольного участка [5].

Оставшиеся от посева семена обезличивают. После появления всходов на каждой деланке ставят этикетку с названием сорта и регистрационным номером образца и отбивают по шнуру учетную площадь.

2.4.3. Особенности проведения наблюдений на деланках грунтового контроля

Растения на деланках можно обследовать в течение всего вегетационного периода, поскольку их сортовые характеристики могут проявляться в разные фазы развития. У каждого сорта отмечают даты фенологических фаз, а также проявление поражений болезнями и вредителями. Прежде всего, инспектор на участке грунтового контроля должен убедиться, что деланка представляет именно сорт, заявленный в данной партии семян. Этого можно достичь детальным сравнением некоторого числа испытываемых растений, с растениями, взятыми с деланки со стандартным образцом. Для облегчения задачи на участке грунтового контроля в качестве защитных деланок часто размещают демонстрационные посевы испытываемых сортов.

Затем деланка обследуется на присутствие нетипичных растений, на степень поражения растений болезнями, передающимися через семена. Растения, нетипичные с точки зрения наиболее важных признаков, необходимо изучить более детально. Их отмечают (этикеткой, цветной ниткой) во время первого обнаружения с тем, чтобы впоследствии было легче найти. Эта мера особенно важна в тех случаях, когда нетипичный признак является временным, например различия в окраске проростков или их ускоренный рост в высоту. Для определения нетипичных растений инспектору необходимо иметь соответствующий практический опыт исследований на контрольных деланках. Надо помнить, что грунтовой контроль требует достаточно трудоемких исследований, базирующихся на глубоких знаниях особенностей культуры, мирового ассортимента ее коллекций, участия специалистов разного профиля. Для постоянного обучения специалистов и повышения их квалификации на участках грунтового контроля в странах с уже сложившейся системой сортовой сертификации закладываются деланки из подобранных смесей семян разных видов и разновидностей сельскохозяйственных растений, а также сортов с различными апробационными признаками.

Только подготовленный специалист может правильно решить, что представляют собой отклоняющиеся от описания сорта признаки. У каждого сорта имеется известная степень выраженности различных признаков. Проблема состоит в том, чтобы установить, какие из них выходят за пределы нормальных отклонений, встречающихся внутри сорта, поскольку лишь они будут учитываться как нетипичные при определении сортовой чистоты. Стандартный образец должен служить эталоном влияния окружающих или сезонных условий, которые могут замаскировать или подчеркнуть отклонения, генетически присущие данному сорту.

В дополнение к изучению растений на контрольных делянках существует ряд лабораторных исследований, которые можно использовать для определения сортовой подлинности партии семян. В таких случаях с некоторых делянок могут быть взяты образцы растений для более детального изучения их в условиях лаборатории.

Работа в лаборатории может основываться на наблюдении внешних признаков семян, проростков, частей растений. У семян это особенности формы, размера, цвета и других физических параметров. Проросшие семена также могут проявить дополнительные признаки, такие, например, как наличие или отсутствие антоциановой пигментации у проростков ржи. У некоторых видов растений для классификации сортов требуется установление уровня их ploидности. Иногда необходима детализация морфологических признаков, которые использовались при описании сорта, но могут наблюдаться только под бинокулярной лупой. Часто это позволяет выявить отдельные растения, являющиеся примесью в пробе.

В некоторых случаях требуются еще более сложные анализы с использованием биохимических, физиологических тестов, электрофореза и т.д. Например, для рапса могут проводиться тесты на содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов, семена мягкой пшеницы тестируются на фенольную реакцию, что позволяет выявить семена, являющиеся предположительно сортовой примесью.

В случае несоответствия полученных результатов грунтового контроля заявленной по документам сортовой чистоте, второй образец в присутствии производителя семян проверяется на целостность печатей и пломб. Если производитель семян не согласен с результатами грунтового контроля, часть семян второго образца направляется в ближайшую лабораторию сортового семенного контроля. Оставшиеся семена пломбируются обеими сторонами до получения результатов лабораторного сортового контроля. В случае если результаты грунтового и лабораторного сортового контроля совпали, дальнейший анализ образца прекращается. Если результаты не совпали, то встречаются представители участка грунтового контроля, лаборатории и производителя семян для обсуждения полученных результатов. Если необходимо, то анализ повторяется.

2.4.4. Основы проведения грунтового сортового контроля по зерновым культурам (кроме кукурузы)

Этот метод предполагает высев контрольных делянок стандартным образцом для сравнения с контрольными делянками других генераций.

Функции контрольных делянок

1. Подтверждение стабильности свойств и признаков сорта в процессе воспроизводства семян.
2. Проверка на тесты ООС (DUS);
3. Обеспечение эффективной работы апробационных программ.

Обычно грунтовому контролю у пшеницы, ячменя и овса подвергаются семена следующих генераций: оригинальные семена - 100% партий, суперэлита - 100%, элита - 100%, репродукционные семена (1-я и 2-я репродукции) - 10%. В процессе вегетации ведется строгий контроль по тестам DUS (ООС - отличимость, однородность и стабильность).

От партии семян отбирается два образца массой 2 кг каждый

Образец от каждой партии семян высевается на делянке, где должно быть не менее 4000 растений. Обычно по зерновым культурам закладывают по 2 повторности исключительно в целях предосторожности. Если что-то случится с посевами одной повторности, то останется вторая. Учет урожая не производится. Дозы удобрений должны быть не выше средних, чтобы четко просматривались особенности сорта.

- Требуемое число растений достигается на делянках площадью 10 м^2 : ширина (a) = 1,25 м, длина (b) = 8,00 м.

- Расстояние между делянками разных культур (c) должно быть не менее 2,5 м.

- Расстояние между торцами делянок (d) (межделяночные дорожки) равно 1,4 м.

- Расстояние между рядками одной делянки (e) составляет 25 см.

- Расстояние между рядками соседних делянок (f) (межполосная дорожка) должно быть равно 50 см.

В качестве контроля берутся семена из стандартного образца, который сдается в Госкомиссию по испытанию и охране селекционных достижений при оформлении заявки по испытанию на ООС (DUS) и хранится там же в условиях минимального снижения всхожести. Обычно запаса семян от одного стандартного образца хватает на 5 лет, после чего оригинатор сорта его возобновляет.

Таким образом, одновременно на поле будут представлены делянки стандартного образца, оригинальных семян, суперэлиты, элиты и репродукционных семян.

Грунтовой контроль состоит из двух разновидностей контроля: предконтроля и постконтроля.

Предконтроль

Представляет собой одновременное испытание на полевых делянках образцов семян с семеноводческих посевов сорта разных поколений, но одного года урожая. Образцы партий семян на участках предконтроля выращиваются до использования их в семеноводческих посевах и дают дополнительные сведения к апробации. Если партия размножается с целью дальнейшего получения семян, то с помощью него можно получить информацию о подлинности и качестве сорта до момента использования произведенных семян.

В идеале результаты предконтроля должны соответствовать результатам полевой апробации. Если результаты не совпадают, рекомендуется выявить и изучить возможные причины этого. Они могут быть самые различные – от правильности отбора средней пробы семян, до специфического действия гербицидов, используемых в процессе производства, которые могут вызвать нетипичное развитие растений. Кроме того, на результаты испытаний могут оказать влияние различия в технологии обработки контрольной делянки и производственных посевов, различные условия агротехники участков, а также действия производителя семян, если он сознательно уменьшает количество нетипичных растений путем проведения видовой и сортовой прополки перед полевой апробацией.

После выявления причин установленного различия выносятся окончательное решение о выбраковке партии семян.

Несмотря на то, что апробация посевов является необходимым условием схем OECD, дополнение ее результатами тщательно организованного грунтового контроля дает сертифицирующим органам множество преимуществ. Приведем некоторые из них:

1. Анализ растений на участках предконтроля можно проводить так часто, как это необходимо с момента появления всходов до полного созревания;
2. При необходимости возможно изучение в деталях всех растений популяции на делянке;
3. Анализ растений проводится на основе сравнения со стандартным образцом сорта;
4. Возможен сравнительный анализ семян одного сорта в рамках нескольких последующих поколений;
5. Поскольку участок предконтроля должен быть свободен от сортовых примесей, контрольный орган может быть абсолютно уверен, что все выявленные сортовые примеси присутствовали в образце семян;
6. Негативные результаты испытания могут быть использованы контрольными органами как основание для выбраковки семенных посевов из соответствующей партии семян.

Предконтроль можно проводить в тепличных условиях или регионах с возможной вегетацией в зимний период.

Постконтроль

Полевые деланки проб от коммерческих партий семян (семена использованы для товарных посевов, и полевое испытание по системе грунтоконтроля идет параллельно, в данном случае устанавливается уровень семеноводческой работы того или иного предприятия на последнем этапе производства семян).

Постконтроль, в отличие от предконтроля, представляет собой испытание образцов коммерческих партий семян. То есть, партия семян, находящаяся на испытании, уже высеяна в целях производства продуктов питания или сырья. Понятно, что результаты испытания будут получены слишком поздно для того, чтобы предпринять что-либо существенное в случае неподтверждения ее сортовых качеств. Тем не менее, постконтроль имеет положительное значение, поскольку помогает установить эффективность семеноводческой работы того или иного предприятия с точки зрения поддержания чистоты сорта. Имея возможность провести сравнительный анализ растений из партии семян, находящейся в производстве, и стандартного образца, сертифицирующий орган может контролировать качество и определять соответствие минимальным принятым стандартам. Эти данные зачастую имеют решающее значение при арбитражных разбирательствах.

Кроме того, при проведении грунтового контроля партий семян, предназначенных для дальнейшего размножения, с одного и того же контрольного участка получают результаты постконтроля для партий семян, возделываемых в текущем году, и, одновременно, результаты предконтроля для партий семян, предназначенных для посева в следующем сезоне.

Признаки, используемые для определения подлинности сорта

У каждого сорта имеется множество признаков, которые используются для определения его подлинности. Например, в эталонной коллекции UPOV по ячменю описано несколько десятков морфобиологических признаков сортовой идентификации. Так как при грунтовом контроле практически невозможно исследовать каждый образец по всем возможным признакам, необходимо установить их основные группы для каждого сорта установлены их основные группы :

1. Морфобиологические признаки, которые легко и отчетливо обнаруживаются на растении в период вегетации, легко поддаются визуальной оценке. Обычно это отличия по форме, размеру (длина, ширина и т.п.), окраске и т.д. Они относятся к группе первичных признаков.

2. Морфобиологические признаки, которые можно обнаружить лишь при детальном изучении отдельных частей растения. Например, опушение листа, колоса, строение лодикул и т.д. Это группа вторичных признаков.

3. Признаки, требующие для их выявления применения специальных методик. Например, реакция зерен пшеницы на фенол, устойчивость к специфическим для разных сортов рас болезням и т.д.

В настоящее время при проведении грунтового контроля удобнее всего оценивать степень выраженности признаков, по которым проводятся испытания на отличимость, однородность и стабильность по системе UPOV. Приведенные ниже шкалы признаков для культур, входящих в 4 схемы сортовой сертификации ОЕСД, к которым в 2001 г. присоединилась Россия, не являются исчерпывающими. Тем не менее, они включают наиболее важные признаки, которые рекомендуется учитывать при оценке сортовой чистоты. Эти шкалы содержат первичные и вторичные признаки, которые были детально изучены и по использованию которых в области сортовой идентификации имеется взаимное соглашение между UPOV и ОЕСД.

Используемые для идентификации признаки сорта могут быть качественными или количественными и обозначаются при помощи последовательных чисел в зависимости от степени их выраженности, начиная с 1 до 9. Наименьшим значениям признака присваивают меньшие цифры. По признакам с альтернативным проявлением значение «отсутствует» обозначается цифрой 1, а «имеется» – цифрой 9 [3].

Заключительный этап – сопоставление % полученных примесей с предельно допустимым их количеством.

В таблице 3 приведено необходимое количество растений на делянке и минимальное количество обнаруженной в них сортовой примеси, при которой происходит выбраковка образца, как несоответствующего стандарту сортовой чистоты.

Табл. 3. Предельные количества примесей для браковки посевов овса, ячменя, мягкой и твердой пшеницы

Количество растений:		Предельное количество примесей при существующих стандартах сортовой чистоты			
на 1 га	на 10 м ²	ОС (99,9%)	ЭС (99,7%)	РС (98,0%)	РСп (97,0%)
3600000	3600	7	17	89	128
4200000	4200	8	20	102	138
4500000	4500	9	21	109	148
4800000	4800	9	22	115	158
5100000	5100	10	23	122	168
5400000	5400	10	24	128	177
5700000	5700	10	25	135	187
6000000	6000	11	26	141	197

В настоящее время политика государства в области селекции и семеноводства базируется на законах Российской Федерации «О селекционных достижениях», «О семеноводстве», «О лицензировании отдельных видов деятельности» и нормативных правовых документах в их развитие. Однако широкое применение законодательной базы в отрасли, можно сказать, только

начинается. Методика первичного семеноводства и сортовой идентификации при сертификации должна ориентироваться на признаковую шкалу UPOV. Мы достаточно подробно это рассмотрели выше. Особенно важно внедрение системы грунтового контроля с учетом присоединения России к 4 схемам сортовой сертификации семян Организации экономического сотрудничества и развития (OECD).

Грунт-контроль наиболее приемлем для арбитражных целей, а также для научных исследований, направленных на совершенствование методов семенного контроля.

Так как проводился сортовой контроль ярового ячменя, рассмотрим биологические особенности этой культуры.

Биологические особенности ярового ячменя

Род *Hordeum* L. включает один вид культурного (*H. sativum*) и много видов дикого ячменя. В зависимости от числа развитых (дающих зерно) на уступе колосового стержня культурный ячмень делят на три подвида.

1. *H. vulgare*. Многорядный – по 3 развитых колоска.

2. *H. intermedium*. Промежуточный – разное количество развитых колосков в пределах колоса.

3. *H. distichon*. Двурядный – развит один центральный колосок из 3. По степени развития боковых бесплодных колосков делится на 2 группы разновидностей:

- *nutantia*, – боковые бесплодные колоски дают цветок с цветковыми чешуями, иногда встречаются фертильные пыльники, но зерно никогда не развивается.

- *deficientia* – боковые бесплодные колоски состоят только из колосковых чешуй, иногда отсутствуют.

В посевах двурядные ячмени представлены только группой *nutantia*, растения второй группы *deficientia* встречаются как примеси, чаще в Закавказье. Каждый подвид ячменя делится на разновидности. Наиболее распространены из двурядных – нутанс и медикум, из многорядных – паллидум.

Ячмень – типичный самоопылитель, цветение и оплодотворение часто происходят до выколашивания. Это самая скороспелая культура, вегетационный период длится 60...110 дней. Относится к растениям длинного дня. Продуктивная кустистость выше, чем у пшеницы и овса.

Яровой ячмень, как и другие зерновые культуры, проходит 12 основных этапов органогенеза. В отличие от озимого ячменя I и II этапы проходят быстрее, за 10-15 дней. Межфазный период всходы – 3-й лист продолжается 7-11 дней. Фаза кущения наступает примерно через 10-20 дней после всходов, выход в трубку – колошение занимает 15-20 дней, а через 12-15 дней наступает молочная спелость.

Это культура умеренных температур. Ранние и дружные всходы появляются при 5-7⁰ С. Оптимальная температура для прорастания 15-20⁰. всходы переносят заморозки -3-4, иногда до -7-8⁰С. Важен ранний посев. В период цветения и налива зерна ячмень повреждается при -2⁰. Зерно, поврежденное морозами, теряет всхожесть. Ячмень более устойчив к высоким температурам, чем пшеница и овес. При 38-40⁰С устьица листьев ячменя утрачивают способность закрываться через

25-30 °C. Для полного развития ячменя требуется сумма активных температур 1000-1500⁰C для скороспелых сортов и 1800-2000⁰ - для позднеспелых.

Среди ранних яровых зерновых ячмень – самая засухоустойчивая культура. Наибольшее количество воды потребляет в периоды выхода в трубку и колошения. Повышенная влажность и умеренная температура способствуют образованию и росту вторичной корневой системы, вместе с тем ячмень чувствителен к избыточному увлажнению.

Для ярового ячменя пригодны любые почвы, кроме кислых заболоченных, песчаных и солонцеватых. Лучшими являются плодородные структурные почвы с нейтральным pH (6,5-7,5).

В России выведено и допущено к использованию более 60 сортов ярового ячменя [15].

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Цели и задачи

Целью данной работы являлось изучение двух распространённых методов сортового контроля семян - грунтового, основанного на сравнении морфологических критериев и электрофореза, определяющего сортовую чистоту по полиморфизму запасных белков семян.

3.2. Материалы и методы

3. 2.1. Материалы

Объектом анализа являлись семена ярового ячменя сорта Эльф. С помощью грунтового контроля и электрофореза запасных белков проверялись семена 15 образцов из различных областей Центрального района - Тульской, Орловской, Рязанской, Московской. Все эти образцы должны были быть полностью идентичными, т.к. по документам относились к одному сорту. В качестве контроля в полевом анализе были взяты оригинальные семена из НИИСХ ЦРНЗ.

На следующий год был проведён электрофоретический анализ по спектрам гордеинов всех образцов по методике ИОГен РАН. Выборка составила по 100 семян из каждой партии.

Характеристика сорта ярового ячменя Эльф

Создан ГНУ НИИСХ ЦРНЗ совместно с Рязанским НИИПТИ АПК. Получен методом индивидуального отбора из гибридной популяции:

F₃ (Roland x Линия 1325)

Включен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию с 1997г. Рекомендован для областей Центрального, Волго-Вятского, Северо-Западного, Средне-Волжского и Западно-Сибирского регионов России.

Хозяйственные и биологические особенности.

Сорт с широкой экологической пластичностью, высоким генетическим потенциалом продуктивности, достигающим в условиях Центрального района 8т\га. Превышает по урожайности стандартные сорта на 8-12%.

Среднеспелый, вегетационный период 75-90 дней, созревает на 6-10 дней раньше стандартного сорта Зазерский 85. Имеет быстрый стартовый рост и стеблестой высокой плотности.

Среднерослый, устойчив к полеганию, соломина прочная, средней толщины. Высота растения-70-85см.

Пригоден для выращивания на разных типах почв, но лучше развивается на хорошо окультуренных, средних по механическому составу почвах. Благодаря эректоидному расположению листьев формирует хорошо освещённый ценоз. Это

способствует хорошей выживаемости и развитию подпокровного посева многолетних трав.

Диапазон норм высева составляет от 4 до 6 млн. всхожих семян на га.

Устойчив к поражению мучнистой росой. Слабо восприимчив к поражению пыльной головней и пятнистостями листьев.

Содержание белка в зерне варьирует в пределах 9-12%, лизина – 0,39-0,48%. Экстрактивность зерна - 79-81%, семена крупные, выровненные, округлой формы. Масса 1000 шт.- 43-48г.

В 1998г. включен в список ценных пивоваренных сортов ячменя.

Основные апробационные признаки

Разновидность – putans. Колос цилиндрический, двурядный, имеет желтую окраску, среднюю длину и плотность. В период налива и созревания – прямостоячий. Ости длинные, параллельные колосу, средней грубости, эластичные, зазубренные. В отдельные годы в период налива концы остей могут приобретать антоциановую окраску. Нервы цветочной чешуи слабозазубренные. Опушение основной щетинки слабое.

3.2.2.Методика проведения грунтового контроля.

Образец от каждой партии семян высевается на делянке, где должно быть не менее 4000 растений. Обычно по зерновым культурам закладывают по 2 повторности исключительно в целях предосторожности. Если что-то случится с посевами одной повторности, то останется вторая повторность. Учет урожая не производится, высокие дозы удобрений не рекомендуется применять. Дозы удобрений должны быть не выше средних, чтобы четко просматривались особенности сорта.

Требуемое число растений достигается на делянках площадью 10 м²: ширина (a) = 1,25 м, длина (b) = 8,00 м.

Расстояние между делянками (c) разных культур - не менее 2,5 м.

Расстояние между торцами делянок (d) (межделяночные дорожки) = 1,4 м.

Расстояние между рядками одной делянки (e) составляет 25 см.

Расстояние между рядками соседних делянок (f) (межполосная дорожка) должно быть равно 50 см.

В качестве контроля берутся семена из стандартного образца, который сдается в Госкомиссию по испытанию и охране селекционных достижений при оформлении заявки по испытанию на ООС (DUS) и хранится там же в условиях минимального снижения всхожести. Таким образом, одновременно на поле будут представлены делянки стандартного образца, оригинальных семян, суперэлиты, элиты и репродукционных семян.

Наблюдения за растениями ведутся в течение всей вегетации. Все 33 сортовых признака ячменя фиксируются в определенную стадию развития по шкале Фекеша и сравниваются с признаками эталона (стандарта) (табл.4).

В нашем исследовании проводился грунт-контроль оригинальных семян и семян различных этапов размножения – суперэлиты, элиты, I, II, III репродукций.

Таблица 4
Форма RTG 19-1 Ячмень

Оценка отличимости, однородности и стабильности

Сортоучасток _____
Сорт _____

Год 200 _____
Код _____

№ п/п	Признак	Порядок учета	Индекс эталона	Степень выраженности	Сорт- эталон	Индекс нового сорта
1	Растение:тип куста	25 – 29 VG	1 3 5 7 9	прямостоячий полупрямостоячий промежуточный полустелющийся стелющийся	Midas Mazurka Julia Emir Claudia	
2	Нижние листья: опушение листовых влагалищ	25 – 29 VG	1 9	отсутствует присутствует	Aramir Ceres, Sonia	
3	Флаговый лист: встречаемость растений с наклоненным флаговым листом	49 VG	1 3 5 7 9	отсутств.или оч. Низкая низкая средняя большая очень большая	Katy Goldmarker Koaur Athos Sultan	
4	Флаговый лист: антоциановая окраска ушек	45 – 49 VG	1 9	отсутствует присутствует	Sultan Claudia	
5	Флаговый лист: интенсивность антоциановой окраски ушек	45 – 49 VG	1 3 5 7 9	очень слабая слабая средняя сильная очень сильная	Midas Berenice Claudia Athos Tyra	
6	Флаговый лист: восковой налет на влагалище	50 – 60 VG	1 3 5 7 9	отсутствует или оч. слаб. слабый средний сильный очень сильный	----- ----- Goldmarker Athos Midas	
7	Время выколашивания (1-й колосок виден у 50% колосьев)	50 – 52 VG	1 3 5 7 9	очень раннее раннее среднее позднее очень позднее	Akka Tyra, Igri Aramir, Kiruna Julia, ,Otter Magnum, Maris	
8	Антоциановая окраска кончиков остей	60-65 VG	1 9	отсутствует присутствует	Sultan Julia	
9	Ости: интенсивность антоциановой окраски кончиков	60-65 VG	1 3 5 7 9	очень слабая слабая средняя сильная очень сильная	Mazurka Berenice Julia Berac Tyra	
10	Колос: восковой налет	65-70 VG	1 3 5 7 9	отсутствует или оч. слаб. слабый средний сильный очень сильный	Carina Tern Mazurka Aramir Varunda	
11	Колос: положение	70 VG	1 3 5 7 9	прямостоячий полупрямостоячий горизонтальный полупониклый пониклый	Rupal Athos Adorra Carina	
12	Растение: высота (стебель + колос)	75-92 M	1 3 5 7 9	очень короткая короткая средняя длинная очень длинная	Hood Claudia; Igri Aramir; Bantend Vazurka; Doris Gerkra	
13	Колос: количество рядов	80-92 VS	1 2	два больше двух	Aramir Cerbil	
14	Колос: форма	80-92 VS	1 2 3	пирамидальных цилиндрический веретеновидный	Harry Aramir Beka	
15	Колос: плотность	80-92 VS	1 3 5 7 9	очень рыхлый рыхлый средний плотный очень плотный	Beka Aramir Julia Emir	

продолжение таблицы 4

16	Ость: длина по сравнению с колосом	80-92 VS	1 2 3	короче равна длиннее	Midas Carina Tyra	
17	Ость: зазубренность краев	92 VS	1 9	отсутствует присутствует	Kron Aramir	
18	Стержень колоса: длина первого сегмента	92 VS	1 3 5 7 9	очень короткий короткий средний длинный очень длинный	Varunda Emir Claudia Beralé Kron	
19	Стержень колоса: изгиб первого сегмента	92 VS	1 3 5 7 9	отсутствует или оч. слаб. слабый средний сильный очень сильный	Varunda Proctor Carina Adorra	
20	Двурядный ячмень Стержень колоса : наличие горбинки на сегменте	92 VS	1 3 5 7 9	отсутств. или оч. слабая слабая средняя сильная очень сильная	Midas Athos Berenice Sultan	
21	Многорядный ячмень Стержень колоса: зигзагообразность расположения сегмента	92 VS	1 3 5 7 9	отсутств. или оч. слабая слабая средняя сильная очень сильная		
22	Стерильный колосок: расположение	92 VS	1 2 3	параллельно промежуточное отклоненный	Kristina Claudia Aramir	
23	Стерильный колосок: длина нижней цветковой чешуи	92 VS	1 3 5 7 9	очень короткая короткая средняя длинная очень длинная	Rupal Julia Mazurka Quantum	
24	Стерильный колосок: форма кончика	92 VS	1 2 3	заостренный округлый прямой	Kriatina Maris Otter Alpha	
25	Средний колосок: длина колосковой чешуи и ости по отношению к зерновке	92 VS	1 2 3	короче равна длиннее	Astrix Athene Hoppel	
26	Зерновка: тип опушения щетинки	92 VS	1 2	короткое длинное	Mazurka Aramir	
27	Зерновка: плёчатость	92 VS	1 9	отсутствует присутствует	Nudinka Aramir	
28	Зерновка: антоциановая окраска нервов наружной цветковой чешуи	85 VS	1 3 5 7 9	отсутств. или оч. слабая слабая средняя сильная очень сильная	Mazurka Adorra Julia Korn Tyra	
29	Зерновка: зазубренность внутренних боковых нервов наружной цветковой чешуи	92 VS	1 3 5 7 9	отсутств. или оч. слабая слабая средняя сильная очень сильная	Julia OSIRIS Athos Banteng	
30	Зерновка: опушение брюшной бороздки	92 VS	1 9	отсутствует присутствует	Julia Carina	
31	Зерновка: расположение лодикул	92 VS	1 2	переднее охватывающее	Athos Aramir	
32	Зерновка: окраска алевронового слоя	92 VS	1 2	белая окрашенная	Sonja Igri	
33	Тип развития	VG	1 2 3	озимый двуручка яровой	Sonja Kiruna Aramir	

Закключение по однородности и стабильности

Исполнитель _____ (подпись) _____ Ф.И.О.

Для сравниваемого сорта добавлен столбец справа. Ниже дают заключение по однородности и стабильности. Исполнитель заверяет анализ своей подписью.

По каждому признаку указан метод его учета:

М - непосредственное измерение;

VG -визуальная однократная оценка группы растений (колосьев, зерен);

VS - визуальная оценка определенного количества отдельных растений (колосьев, зерен).

Наблюдение велось от стадии всходов до полного созревания. Оптимальное время проведения учета указано в виде фазы развития растения по шкале Фекеша. Каждый признак оценивался по нескольким градациям- от 1 балла – очень слабой до 9 баллов - очень сильной степени проявления признака (4).

Для определения отличимости и стабильности обследовали не менее 20 растений или их частей (колосьев, стеблей, листьев, зерен), а для однородности – 100 растений или их частей), т.к. определение сортовой чистоты (гомогенности) являлось первостепенной задачей.

Признаки делятся на три группы:

1. по целому растению-с 1-го по 7-й (тип куста, флаговый лист)
2. по колосу – с 8-го по 26-й (характер остей, плотность колоса)
3. по зерну – с 27-го по 32-й.

Признаки должны быть стабильными и колебания даже между двумя соседними градациями уже говорят о возможном засорении.

При испытании на отличимость сорта считаются различными, если отличие между ними проявилось по крайней мере в одном месте испытания, явно выражено и постоянно.

В случае качественных признаков разница между сортами считается достоверной, если соответствующие признаки имеют разные значения выраженности.

Если различия между сортами оцениваются измеряемыми признаками, то разница признается существенной, если ошибка измерений не превышала 1%. За основу можно принять наименьшую существенную разность (НСР).

Морфологические признаки расположены в хронологическом порядке их проявления, начиная со времени посева и кончая уборкой и после нее.

Качественные признаки индексируются при помощи последовательных чисел в зависимости от степени их выраженности, начиная с 1. Наименьшим значениям признака присваивают меньшие цифры.

Количественные признаки по степени выраженности признаков объединены таким образом, что для слабых или сильных степеней подобрана соответствующая словесная пара, например:

слабый - сильный

короткий - длинный

маленький – большой

По признакам с альтернативным проявлением значение «отсутствует» обозначается цифрой 1, а «имеется» - цифрой 9.

3.2.3. Методика электрофореза запасных белков ячменя в крахмальном геле, используемая в сортовом контроле.

1) Необходимое оборудование.

1. Источник постоянного тока с параметрами на выходе:

V (напряжение) до 600 вольт,

A (сила тока) до 400 миллиампер.

Этим условиям удовлетворяют источники питания:

УИП-1,2301 MACRODRIVE-1, Фирма LKB.

DESATRONIC 2000/300, Фирма Desaga.

2. Приборы для электрофореза: (рис.5):

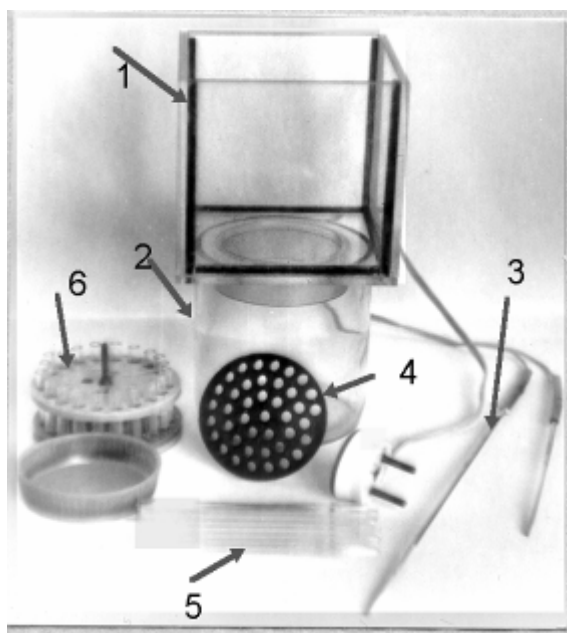


Рис.6. Приборы для электрофореза гордеинов в крахмальном геле:

1 - верхняя камера; 2 - нижняя камера; 3 - электроды; 4 - резиновая пробка; 5 - стеклянные трубки; 6 - штатив с пробирками для проб

а) Верхняя камера. Изготовлена из органического стекла толщиной 5 мм, представляет 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 внутренним диаметром 69 и 71 мм. Меньший диаметр кольца прилегает к грани камеры.

б) Нижняя камера. Представляет собой обыкновенный химический стакан емкостью 800 - 1000 мл.

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

г) Стекланные трубки длиной 120 мм, внешним диаметром 7 мм и внутренним диаметром 4 - 5 мм.

д) Электроды из нержавеющей стали, представляющие собой стержни толщиной от одного до трех мм и длиной 300 мм (-) и 200 мм (+), припаянные к обычному двухжильному электрическому проводу с двухполюсной электрической вилкой на конце.

е) Три емкости с размерами: ширина – 280 мм, длина – 400 мм, высота - 240 мм, для фиксации, окрашивания и отмывки гелей после электрофореза, соответственно.

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;

з) Круглодонная колба 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) Пробирки микробиологические для гелей и штативы для пробирок.

3. рН-метр.

4. Магнитная мешалка типа ММ -15

5. Электромеханическая мешалка (для приготовления больших объемов фиксирующего и окрашивающего растворов) типа MR-25.

6. Водоструйный насос или масляный вакуумный насос.

7. Колбу Бунзена емкостью 2 - 3 л. и воронку 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 со штативом для фотоаппарата для фотографирования гелей.

13. Вытяжной шкаф.

14. Холодильник бытовой.

15. Аквадистиллятор.

16. Весы лабораторные, типа ВЛТК-500.

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.
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.

3) Отмывка крахмала.

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

4 - 5кг картофельного крахмала, предварительно просеянного через сито 0,1мм, заливают 3 - 4л 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 следует размять руками до получения возможно меньших комочков, снова заливают дистиллятом 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 0,5кг требуется примерно 150 - 200мл ацетона). Это нужно для того, чтобы на влажном крахмале не поселились микроорганизмы. Затем подсушенный крахмал выкладывают на фильтровальную бумагу и оставляют при комнатной температуре на 2 суток (до исчезновения запаха ацетона). Высушенный крахмал вновь просеивают через сито 0,1мм и помещают в плотно закрывающиеся сосуды. Отмывку следует проводить в течение дня во избежании закисания крахмала. В случае необходимости крахмал залитый водой можно оставить на ночь в холодильнике.

4) Гидролиз крахмала.

Отмытый высушенный крахмал подвергают частичному кислотному гидролизу. 400г крахмала помещают в емкость с притертым горлом (или плотно закрывающейся крышкой), которую помещают в термостат при температуре 38,5°C и оставляют на ночь. Емкость не закрывать! В этот же термостат и на это же время помещают плотно закрытую емкость с 1л безводного ацетона. Это делается для того, чтобы крахмал и ацетон нагрелись до требуемой температуры. Перед гидролизом в ацетон добавляют 12мл концентрированной соляной кислоты и эту смесь 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 38,5°C в закрытом виде.

В зависимости от партии крахмала время гидролиза, после которого получается крахмал для приготовления гелей требуемого качества, может колебаться от 30 до 50 мин. Это время подбирается опытным путем на небольших (50 - 100г) навесках крахмала. После окончания времени гидролиза его останавливают раствором уксуснокислого натрия (28 г CH_3COONa на 500мл дистиллированной воды), выливая раствор в смесь ацетона, соляной кислоты и крахмала. Содержимое сосуда следует тщательно перемешать. После остановки гидролиза крахмал переносят на воронку Бюхнера на предварительно помещенный туда бумажный фильтр для удаления ацетона и промывки крахмала дистиллятом для удаления образовавшейся соли (NaCl) и уксусной кислоты. Для этих целей на 400 г крахмала требуется не менее 3л дистиллята.

После отмывки водой, крахмал подсушивают ацетоном (как при отмывке крахмала) и выкладывают на фильтровальную бумагу для сушки. После высушивания крахмал просеивают через сито 0,1мм.

Оптимальным считается гидролиз, позволяющий получать 12 - 14%-ные гели с хорошими механическими свойствами. 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.

5) Приготовление фиксирующего и красящего растворов.

Для приготовления фиксирующего раствора 1000 гр. ТХУ растворяют в 20 л дистиллированной воды.

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 механической мешалки. Раствор перемешивают в течение 1,5 - 2 часов до полного растворения нигрозина.

Растворы переливают в специальные емкости (Ie). 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.

6) Приготовление буфера.

Для электрофореза в крахмальном геле используется алюминий-лактатный буфер. На 1л буфера берут 1,5г лактата алюминия и доводят значение рН молочной кислотой до 3,2. Один раз определив необходимое количество молочной кислоты для получения рН буфера 3,2 для конкретных фасовок лактата и молочной кислоты, в дальнейшем рН-метром можно не пользоваться.

7) Приготовление крахмального геля.

Крахмальный гель готовят на буфере с добавлением мочевины до 3-х молей. Расчетное количество гидролизованного крахмала, мочевины и буфера (табл. 3) помещают в круглодонную колбу емкостью 1л. Колбу с содержимым при постоянном энергичном помешивании нагревают на пламени спиртовки. По мере нагревания, находящаяся в колбе смесь становится вязкой, а затем разжижается и становится прозрачной. Заваривать гель следует до начала закипания. После заваривания гель в колбе деаэрируют при помощи масляного или водоструйного вакуумного насоса.

После деаэрации гель заливают в трубки. Для формирования одинаковых столбиков геля, стеклянные трубки длиной 120 мм, внешним диаметром 7 и внутренним - 4мм вставляются в резиновую пробку толщиной 1см с отверстиями (обычно отверстий 41 расположенных по спирали) таким образом, чтобы они не выходили за обрез пробки. Затем пробку с трубками плотно вставляют в крышку таким образом, чтобы между обрезом пробки и дном крышки оставалось свободное пространство 2 - 3 мм. После этого в центральную трубку с помощью груши с клапаном закачивают заваренный деаэрированный гель (рис. 7). 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 влажным 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.

Таблица 5.

Соотношение компонентов для приготовления крахмального геля

% геля	16		15		14		13		12		11	
Крах- мал г	б мл	м гр	б мл	м гр	б мл	м гр	б мл	м гр	б мл	м гр	б мл	м гр
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

б- буфер (мл); м- мочевины (гр)

8) Приготовление экстрактов белков.

Обычно для приготовления экстрактов зерно растирают в ступке, заливают экстрагирующим раствором, центрифугируют. Мы используем способ не требующий растирания зерна в ступке и центрифугирования.

Зерно помещают в емкость (пробирки или банки), заливают до полного погружения 1,5%-ным водным раствором фенола, плотно закрывают и ставят в термостат при температуре 38,5°C на 18 - 20 часов. После такой обработки зерно становится мягким и легко освобождается от пленок. Очищенный эндосперм помещают в стеклянные пробирки емкостью ~0,5мл, заливают 150 - 200 микролитрами 70%-ного этилового спирта и растирают его стальной палочкой. В конечном итоге соотношение осадок/спирт должно быть примерно 1:1. После этого пробирки с пробами помещают в эксикатор с насыщенными парами спирта на ночь или на 1,5 - 2 часа до полного осветления экстракта в пробирках.

9) Нанесение проб на гель.

Трубки с гелем вставляют в отверстия пробки, располагая их в три уровня для удобства нанесения. В свободное пространство трубок с гелем наносится примерно 80 - 100 микролитров экстракта. Перед нанесением экстракта в 1 - 2 трубки помещают по 1-й капле раствора пиронина G (в 20%-ном растворе сахарозы растворяется небольшое количество красителя до появления ярко красной окраски). Пиронин движется ровно в 2 раза быстрее самых быстромигрирующих компонентов гордеина и используется как метка для определения окончания электрофореза. Нанесенные на гели экстракты присыпаются сухим гидролизованным крахмалом - антиконвекционная среда. Можно использовать и крахмал после пробных или неудачных гидролиз. Крахмал присыпают постепенно и таким образом, чтобы не оставалось свободного экстракта, а поверхность крахмала была влажной.

10) Электрофорез

После нанесения проб пробку с трубками помещают в верхнюю камеру для электрофореза. В камеры вставляют электроды (верхняя камера "+", нижняя камера "-") из нержавеющей стали и подключают к источнику постоянного тока. (рис. 8). Стабилизация идет по напряжению - 350v. Через 15 минут после начала электрофореза, когда белки войдут в гель, прибор отключают от источника питания, из верхней камеры буфер выливают в стакан и водой вымывают из трубок крахмал, использованный для присыпки. Затем трубки вновь заливают буфером и электрофорез продолжают. При этом нужно следить, чтобы в свободном от геля пространстве трубок не оставались воздушные пробки. Смывание крахмала резко (в 2 раза) снижает сопротивление и значительно сокращает время электрофореза. Когда первая метка пиронина подойдет к нижнему обрезу трубок, 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 в помещении может колебаться от 1ч. 45мин. до 2ч. 15мин.

После окончания электрофореза гели с помощью груши выдавливают из трубок в специальный штатив, 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 горячей 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.

Крахмальные гели при необходимости можно законсервировать и хранить в течение нескольких лет. Для этого гели помещают в пробирки с насыщенным раствором поваренной соли и плотно закрывают (28).

Изложенная методика основывается на методике, разработанной в Одесском селекционно-генетическом институте (33).

3.3. Место и условия проведения эксперимента.

Грунтовый контроль сорта Эльф проводился в 2002г. на селекционной станции им. П.И. Лисицина.

Таблица 6.

Метеорологические данные за 2002 год

Средние данные	Апрель			Май			Июнь			Июль		
Декады 2002 года	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Средняя t воздуха °C	1,0	9,1	12,4	15,2	11,0	12,8	16,2	17,7	18,2	22,6	22,2	24,2
Средняя относительная влажн. возд %	48	53	62	55	64	52	57	65	60	54	55	49
Среднее давление, гПа	1002	1001	999	1004	994	994	996	992	992	1000	998	996
Количество осадков, мм	6,3	4,8	4,4	2,0	14,1	3,5	2,1	25,9	23,6	10,3	15,1	5,4
Средний дефицит влажности воздуха ,мб.	3,9	6,4	6,1	8,4	5,7	8,0	9,3	9,3	9,7	14,1	13,8	17,3
Средняя абсолютная влажность,мб	3,1	5,7	8,6	8,9	8,3	7,4	9,9	12,2	11,9	14,3	13,8	13,9

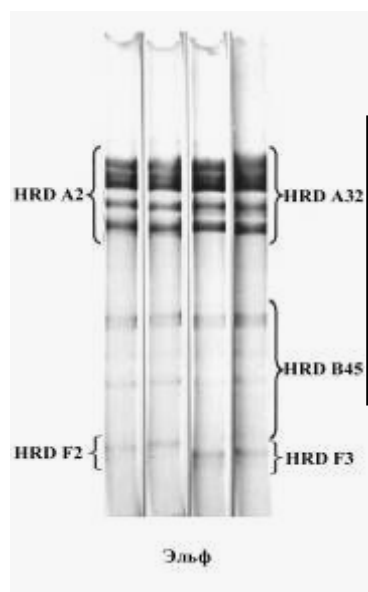
В 2002 году были посеяны образцы 15 партий семян сорта Эльф и признаковая коллекция ячменя, характеризующая 33 признака (30 сортов). Посев

образцов партий проводился сеялкой СН-10Ц в двукратном повторении, общая площадь делянки – 12,5 м², учетная площадь – 10 м², площадь пробных площадок – 0,5 м². Признаковая коллекция высевалась вручную. Все признаки у 15 образцов в течение вегетации сравнивали с соответствующими признаками у коллекционных сортов. После уборки в лабораторных условиях был проведен анализ по части признаков колоса и по зерну.

Электрофорез проводился в институте генетики им. Вавилова.

Формула компонентов гордеина для сорта Эльф выглядит следующим образом:

Рис.7.



HRDA 2+32 HRDB 45 HRD F 2+3

Это значит, что сорт Эльф-гетерогенный и представлен двумя биотипами:

- 1) 2-45-2
- 2) 32-45-3

Установлено, что эти биотипы встречаются с вероятностью 50%

3.4. Результаты и их обсуждение

3.4.1. Результаты по грунт-контролю

Результаты исследования отличимости, однородности и стабильности семян ячменя сорта Эльф на протяжении вегетационного периода по 33 признакам растения, колоса и зерна представлены в таблице 7. В контрольном столбце таблицы, справа в скобках, представлены балловые оценки изученных показателей, содержащиеся в паспорте сорта в Госкомиссии по сортоиспытанию. Из таблицы видно, что по мере размножения семян сорта Эльф в различных хозяйствах возрастает размах изменчивости степени выраженности признаков как по всему растению, так и его частям (колос, зерно). Так, при анализе образцов из южных областей ЦРНЗ по растению от контроля отличался (по интенсивности антоциановой окраски ушек) лишь образец №1 из Рязанской области (элита). Анализ колоса у этих же образцов показал больший разброс изменений по признакам. Отличия от контроля и эталонных данных наблюдались по таким

Таблица 7

Степень выраженности признаков у ячменя сорта Эльф разных репродукций из хозяйств различных районов Рязанской, Тульской и Орловской областей (юг Центрального района)

№ приз- нака	Рязанская область					Орловская область	Тульская область	НИИСХ ЦРНЗ
	хоз-ва №					хоз-во №	хоз-во №	контроль
	1	2	3	4	5	6	15	7
	Р е п р о д у к ц и я							
	элита	I	I	I	II	III	I	оригин. семена
	Р а с т е н и е							
1	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3 (2)
2	1	1	1	1	1	1	1	1 (1)
3	1	1	1	1	1	1	1	1 (1)
4	9	9	9	9	9	9	9	9 (9)
5	3-5	3	3	3	7	3	3	3 (3)
6	5	5	5	5	5	5	5	5 (5)
7	5	5	5	5	5	5	5	5 (5)
	К о л о с							
8	9	9	9	9	9	9	9	9 (9)
9	3	3	3	3	3-5	3	3	3 (4)
10	5-9	3-9	5-9	3-9	5-9	5-9	5-9	5-9 (5)
11	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	3 (3)
12	5	5	5	5	5	5	5	5 (5)
13	1	1	1	1	1	1	1	1 (1)
14	2	2	2	2	2	2	2	2 (2)
15	5	5	5	5	5	3	5	5 (5)
16	3	3	3	2	3	3	3	3 (3)
17	9	9	9	9	9	9	9	9 (9)
18	5-7	3-5	5	5	7	5	5-7	5 (5)
19	5-7	3-7	3-7	3-5	3-7	3-7	3-7	3-7 (5)
20	3-7	1-3	3-5	3-5	3-7	3-7	3-7	1-3 (1)
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	3	1-3	2-3	3	3	1-3	2-3	3 (3)
23	3-5	3	3-5	5	3	5	5	3-5 (5)
24	2-3	2	2-3	2	2	1-3	2-3	2 (2)
25	2-3	1-2	2-3	2-3	2-3	1-3	2-3	1-2 (1)
26	2	2	2	2	2	2	2	2 (2)
	З е р н о							
27	9	9	9	9	9	9	9	9 (9)
28	5	5	5	5	5	5	5	5 (5)
29	3	3	3	3	3	3	3	3 (3)
30	1	1	1	1	1	1	1	1 (1)
31	2	2	2	2	2	2	2	2 (2)
32	1	1	1	1	1	1	1	1 (2)
33	3	3	3	3	3	3	3	3 (3)

Таблица 8

Степень выраженности признаков у ячменя сорта Эльф разных репродукций из хозяйств
различных районов Московской области

№ приз- нака	Одинцовский р-н	Раменский р-н	Можайский р-н				Ступинский р-н	
	хоз-во № контроль	хоз-во №	хоз-во №	хоз-во №	хоз-во №	хоз-во №	хоз-во №	хоз-во №
	7	8	9	10	11	12	13	14
	Р е п р о д у к ц и я							
	оригин семена	оригин семена	элита	II	III	III	элита	элита
Р а с т е н и е								
1	1-3 (2)	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3
2	1 (1)	1	1	1	1	1	1	1
3	1 (1)	1	1	1	1	1	1	1
4	9 (9)	9	9	9	9	9	9	9
5	3 (3)	3	3	3	7	3	3	3
6	5 (5)	5	5	5	5	5	5	5
7	5 (5)	5	5	5	5	5	5	5
К о л о с								
8	9 (9)	9	9	9	9	9	9	9
9	3 (4)	3	3	3	3	3	3	3
10	5-9 (5)	5-9	5-9	7-9	1-9	5-9	5-9	7-9
11	3 (3)	1-3	1-3	1-3	1-5	1-3	1-3	1-3
12	5 (5)	5	5	5	5	5	5	5
13	1 (1)	1	1	1	1	1	1	1
14	2 (2)	2	2	2	2	2	2	2
15	5 (5)	5	5	5	5	5	5	5
16	3 (3)	3	3	3	3	3	3	3
17	9 (9)	9	9	9	9	9	9	9
18	5 (5)	5	5	5	3	3-5	3	5
19	3-7 (5)	1-5	3-7	3-7	1-5	1-7	5-7	1-7
20	1-3 (1)	3	3-7	3-7	1	1	5-7	3
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	3 (3)	3	2-3	2-3	1-2	2-3	3	3
23	3-5 (5)	3	3	5	5	3	5	3
24	1-3 (2)	2	2-3	1-2	2	2	2	2
25	1-3 (1)	2	2-3	2-3	2	2	2-3	2
26	2 (2)	2	2	2	2	2	2	2
З е р н о								
27	9 (9)	9	9	9	9	9	9	9
28	5 (5)	5	5	5	5	5	5	5
29	3 (3)	3	3	3	3	3	3	3
30	1 (1)	1	1	1	1	1	1	1
31	2 (2)	2	2	2	2	2	2	2
32	1 (1)	1	1	1	1	1	1	1
33	3 (3)	3	3	3	3	3	3	3

признакам как интенсивность воскового налета (обр. № 2 и 4), положение колоса (у всех образцов, включая контроль), длина первого сегмента стержня колоса (обр. № 1, 2, 15), наличие горбинки на сегменте стержня колоса (обр. № 1, 3-6, 15), длина колосковой чешуи и ости по отношению к зерновке (обр. № 1, 3-6, 15). Эти отклонения отмечены как у репродукций, так и у элиты.

Степень выраженности признаков у ячменя сорта Эльф из хозяйств Московской области видна из таблицы 8. Здесь также отмечено варьирование показателей. Это говорит о возможном механическом засорении сорта в процессе его размножения, хранения, при транспортировке и других перемещениях или о модификационной изменчивости признаков.

По данным грунтового сортового контроля наибольшие различия у образцов видны по 4-м признакам: 10-восковой налёт на колосе, 11- положение колоса, 19- изгиб 1-го сегмента стержня колоса 20 – наличие горбинки на сегменте колоса. Данные по первым двум признакам представлены в таблице 9 и на двух диаграммах (1 и 2).

Таблица 9

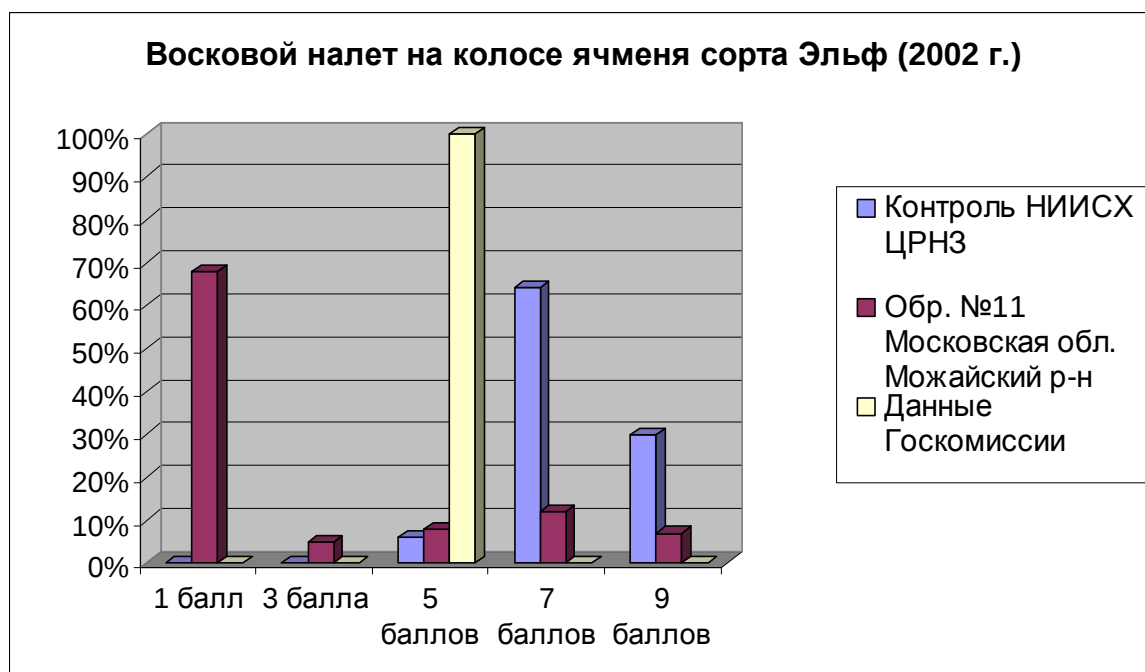
Выраженность воскового налёта и положение колоса у различных партий ячменя сорта Эльф

№ вари- анта.	Восковой налёт, %					Положение колоса,%				
	Степень выраженности, балл					Степень выраженности, балл				
	1	3	5	7	9	1	3	5	7	9
1	-	-	6	49	45	39	61	-	-	-
2	-	1	6	50	53	30	70	-	-	-
3	-	-	1	53	46	36	64	-	-	-
4	-	1	11	75	13	41	58	-	-	-
5	-	-	14	59	27	35	65	-	-	-
6	-	-	10	65	25	30	70	-	-	-
7	-	-	6	64	30	37	63	-	-	-
8	-	-	4	63	33	42	58	-	-	-
9	-	-	2	63	35	41	59	-	-	-
10	-	-	-	85	15	39	61	-	-	-
11	68	5	8	12	7	28	69	3	-	-
12	-	-	5	42	53	39	61	-	-	-
13	-	-	6	61	33	28	72	-	-	-
14	-	-	-	51	49	39	61	-	-	-
15	-	-	1	50	49	41	59		-	-

Данные по восковому налету особенно четко показывают, что образец 11 не является сортом Эльф по данному показателю, т. к. по этому признаку 68% растений соответствуют градации (1), а не (5), как указывает эталон (диаграмма 1). На поле делянка с растениями этого образца была ярко зеленой с вкраплениями отдельных растений с четко выраженным восковым налетом на колосе. У образцов

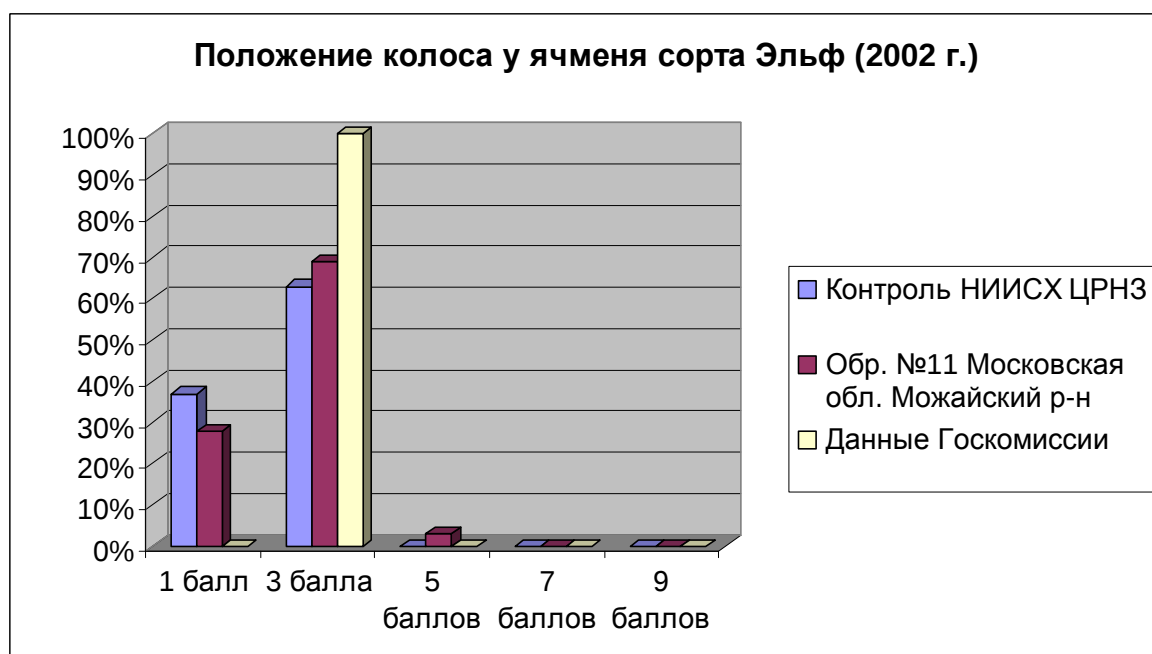
№ 2 и 4 по восковому налёту примерно одинаковое количество растений относятся к градациям (7) и (9), а не (5).

Диаграмма 1



Определенные отличия от контроля и данных паспорта сорта наблюдаются у образца №11 и по такому показателю как «положение колоса» (диаграмма 2).

Диаграмма 2



3.4.2. Результаты анализа по электрофорезу

Электрофоретический анализ нескольких партий семян сорта Эльф представлен в таблице 10.

Таблица 10

№ партии	Хозяйства	Чистота, %	Репродукция	Формула гордеинов примесей	Примеси	Доля примесей, %
1	Рязанская область	100	Элита	-		0
2		93	I	18 67 1	Прима Белоруссия и Рахат	5
3		99	I	18 21 1 2 19 1	- Выбор Гонар Москов.-2	2 1
4		100	I	-		0
5		100	II	-		0
6	Орловская область	100	III	-		0
7	НИИСХ ЦРНЗ (контроль)	100	Оригинальные семена	-		0
8	Раменский район МО	100	Оригинальные семена	-		0
9	Можайский район МО	100	Элита	-		0
10		100	II	-		0
11		Неизвестный сорт * с примесями	III	18 67 3 18 67 1 12 21 1	- Прима Белоруссии или Рахат Мамлюк	1 2 1
12		100	III	-		0
13	Ступинский район МО.	99	Элита	2 8 2	Биос 1, Витим, Роланд Носовск.-9	1
14		97	Элита	2 19 1	Выбор, Гонар или Москов.-2	3
15	Тульская область	100	I	-		0

Примечание. * - сорт с формулой гордеинов А2 В- F-.

Метод лабораторного контроля с использованием электрофореза позволил определить сортовую чистоту семян 15 партий ячменя сорта Эльф. Видно, что из 5 образцов, полученных из Рязанской области, два, относящиеся к I репродукции, имели примеси (7% и 1%). Вероятнее всего это механическое засорение, произошедшее во время уборки, хранения или транспортировки.

Репродукция семян в таком случае не играет роли. Среди образцов есть семена II и III репродукции (№ 5,6,10,12) с сортовой чистотой 100%, и в то же время семена элиты (№ 13, 14) с 1 и 3-мя процентами примесей других сортов.

Образец № 11 из хозяйства Можайского района Московской области вообще не является сортом Эльф. Это неизвестный сорт с примесями. Электрофорез подтвердил данные, полученные с помощью грунтового контроля.

Номера 1,4,5,6,7,8,9,10,12,15 имеют 100% чистоту и соответствуют высоким репродукциям.

4. ВЫВОДЫ

1. Грунтовой контроль является важнейшим элементом сортового контроля и его результаты направлены прежде всего на защиту прав потребителей. При оценке сортов ячменя используются тесты на отличимость, однородность и стабильность по системе UPOV (Международный союз по охране новых сортов растений) в интерпретации OECD (Организация по экономическому сотрудничеству и развитию).

2. Установлено, что по степени выраженности признаков у ячменя сорта Эльф разных репродукций из хозяйств различных районов Рязанской, Тульской, Орловской и Московской областей имеются большие различия, которые не удалось выявить методами апробации.

3. Наибольший размах изменчивости отмечен по следующим признакам: восковой налет на колосе, положение колоса, наличие горбинки на сегменте стержня колоса у двурядного ячменя, а образец № 11 из Можайского района Московской области вообще нельзя отнести к изучаемому сорту.

4. Метод электрофореза позволил установить, что образец № 11 из Можайского района относится к неизвестному сорту с примесями. Лабораторный сортовой контроль способен быть эффективным методом при проведении сравнительных анализов в арбитражных случаях. Можно рекомендовать использование этого метода для хозяйств, устойчивых в финансовом отношении и желающих на добровольной основе дать потребителям более емкую информацию о качестве своих семян.

5. Грунтовой контроль из-за своей относительной простоты и дешевизны, а также высокой разрешающей способности, в ближайшие годы займет достойное место в оценке качества сортовых посевов не только ячменя, но и других сельскохозяйственных культур.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонов А.В. Полиморфизм и специфичность запасных белков эндосперма у представителей рода пырейник (*Elymus* L.). Дис.науч.докл...канд.биол.наук. Новосибирск,1996г.
2. Берёзкин А.Н., Берёзкина Л.Л., Малько А.М., Александров О.В. Грунт-контроль как метод оценки чистоты и подлинности сорта. Доклады ТСХА, № 275, 2003г,5С.
3. Берёзкин А.Н., Малько А.М., ТСХА. Защита экономических интересов селекционеров сельскохозяйственных растений в условиях рынка. Организация семеноводства – основа получения высоких урожаев и высококачественной продукции сельскохозяйственных культур. Пятигорск, 2002г
4. Берёзкин А.Н., Берёзкина Л.Л., Малько А.М. Методика проведения грунтового контроля по группам сельскохозяйственных растений. Минсельхоз, М., 2004г.
5. Берёзкин А.Н., Малько А.М., Смирнова Л.А.. Законодательная база семеноводства на современном этапе. Вестник семеноводства. 2002г.-№2.. 5С.
6. Берёзкин А.Н., Малько А.М., Смирнова Л.А.. Законодательная база семеноводства на современном этапе. Вестник семеноводства. 2002г.-№2.. 5С.
7. Гужов Ю.Л., Фукс А., Валичек П. Селекция и семеноводство культивируемых растений. Мир, 2003г.с.499-502.
8. Документирование партий семян. Минсельхоз., 2001г.
9. Дубинина Е.В. Белковые маркеры в сортовой идентификации риса: Автореф.дис.канд. биол.наук, ВНИИ риса Краснодар,2003г
10. Идентификация сортов пшеницы и ячменя методом электрофореза: Методические указания Л, 1989.
11. Идентификация, анализ и регистрация сортов, линий и гибридов подсолнечника методом электрофореза гелиантина и изоэлектрофокусирования: Методические указания ВИР Л, 1988.
12. Идентификация, анализ и регистрация сортов ежи, овсяницы и плевела методом электрофореза проламинов: Методические указания ВИР Л, 1988.
13. Идентификация стародавних сортов озимой мягкой пшеницы методом электрофореза субъединиц глютеина: Методические указания и каталог белковых формул. СПб,1992.
14. Идентификация, анализ и регистрация сортов, линий и гибридов кукурузы по зеину методами электрофореза и изоэлектрофокусирования: Метод. указания\ ВИР Л.,1987г
15. Кай Ретер. Международный союз по охране селекционных достижений UPOV. Организация семеноводства – основа получения высоких урожаев и высококачественной продукции с\х культр. Пятигорск, 2002г
16. Кононков П.Ф.,Одинцова Т.Ц, Дегтяренко Л.В.. Электрофорез кукурбитина.
17. Крестников Современные методы сортового контроля семян с\х культур И.С..Известия вузов. Пищ. Технология, 1992 № 5-6..

18. Ларионов Ю.С., Ларионова Л.М. Сортовой контроль зерновых культур в современных условиях семеноводства.
19. Либенко Н.А. Эффективность предпосевного грунтового контроля стерильных аналогов материнских форм гибридов подсолнечника. Науч.-технич.бюллетень Всесоюз.сел.-генет.ин-та,1988г. Т1.
20. Методика грунтового контроля элиты по образцам суперэлиты картофеля. Метод. указания, 1984г.
21. Методика грунтового контроля кукурузы, РАСХН 1999г
22. Методика проведения грунтового контроля сортов и гибридов овощных, бахчевых культур, для открытого и защищенного грунта, кормовых корнеплодов и кормовой капусты.МСХА,1987г
23. Методические указания по электрофорезу зеина кукурузы для определения процента гибридности семян F_1 . Инст.генетики М.,1988
24. Методические указания по анализу белков семян и изоферментов методом электрофореза для контроля сортовой чистоты в селекции капустных и тыквенных культур. ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур М.,1990.
25. Методич. указания по анализу белков семян и изоферментов методом электрофореза для контроля сортовой чистоты в селекции капустных и тыквенных культур. ВАСХНИЛ.М.,1993г.,48С.
26. Нецветаев В.П. теоретические основы использования белкового полиморфизма для оптимизации селекционного процесса: Автореф.дис.д-ра биол.наук. ВИР СПб.,2000г.
27. Орел А.Н., Романюк В.Н., Васильева Е.В. Метод электрофореза – новое направление в работе. Агрохимический вестник 2002г.№2
28. Положение о семенном контроле в Российской Федерации от17.10.98г..Селекция и семеноводство. 1998 №4.
29. Поморцев А.А., Кудрявцев А.М., Упелниек В.П., Методика электрофореза гордеинов в крахмальном геле.. Ин-т общ. генетики им.Вавилова РАН, М.,1998г.
30. Поморцев А.А., КудрявцевА.М., Упелниек В.П.,. Методика электрофореза глиадинов пшеницы в полиакриламидном геле. Ин-т общ. генетики им.Вавилова РАН, М.,1998г
31. Посыпанов Г.С Растениеводство. 1997г.. С.163-166.
32. Созинов А.А., Попереля Ф.А. Методика вертикального дискового электрофореза в крахмальном геле и генетический принцип классификации глиадинов.- Одесса, 1978.- 16 с.
33. Терехин М.В Совершенствование методов сортового и семенного контроля семян ячменя в условиях Центрального района Нечерноземной зоны России: Автореф.дис...канд.с\х.наук М,1992г.
34. Упелниек В.П.Анализ спонтанной и индуцированной изменчивости компонентного состава запасных белков яровой мягкой пшеницы: Автореф. дис...канд.биол.наук Ин-т общей генетики им.Н.И.Вавилова М.,1994.

35. Фарбер С.П., Артемьева А.М. Идентификация овощных крестоцветных по запасным белкам семян. ВНИИ раст-ва им. Вавилова (ВИР)Тез.докл..СПб.,2001г
36. Янышина А.А.Совершенствование методики сортового грунтового контроля льна-долгунца.2001г
37. Cerny J.,Sasek A Stanoveni odrudove pravosti psenice a jecmene elektroforezou bilkovinnych genetickych markeru Praha,. 1998г.
38. Dunn M.J. Gel electrophoresis of proteins. Bristol Wright,1986г.