

1. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ СОРТОВОМУ КОНТРОЛЮ

Лабораторный сортовой контроль – это метод определения сортовой чистоты или сортовой типичности сельскохозяйственных растений путем проведения электрофоретического анализа контрольных проб сельскохозяйственных растений.

Контрольные пробы сельскохозяйственных растений, подлежащие лабораторному сортовому контролю, отбираются и оформляются в порядке, определяемом Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь.

Лабораторный сортовой контроль сельскохозяйственных растений проводится на основании *заявления*.

Перечень организаций, уполномоченных на проведение лабораторного сортового контроля сельскохозяйственных растений, устанавливается Министерством сельского хозяйства и продовольствия и включает:

– *учреждение образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия»;*

– *государственное учреждение «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений».*

В обязательном порядке лабораторному сортовому контролю подлежат семена гибридов F₁:

- кукурузы;
- сахарной свеклы.

2. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ

2.1. Методика проведения электрофореза

Для идентификации сорта, линии, биотипа и отдельного растения используют электрофоретический метод анализа запасных белков.

Электрофоретический анализ основан на разделении в геле белковых молекул, являющихся компонентами семян сельскохозяйственных растений и различающихся по заряду и размерам, путем их движения в электрическом поле.

Метод гель-электрофореза внедрен в середине 60-х годов для выявления генетически контролируемого полиморфизма по белкам.

Различные белки представлены различными наборами аминокислот.

Пять из 20 наиболее распространенных аминокислот, составляющих белки, несут электрический заряд. Заряд таких аминокислот, как аргинин, гистидин, лизин является положительным, а таких как аспарагиновая и глутаминовая кислоты – отрицательный. Следовательно, различные белки имеют отличающийся суммарный заряд.

Это свойство белков используется при электрофорезе для разделения их смесей на основе заряда: если по локусу, кодирующему белок, обнаруживаются аллельные различия, то суммарный заряд белка также отличается.

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

- 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;

- электрофореграммы белков не должны зависеть от условий, места выращивания, длительности и условий хранения семян;

- 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 (например, по электрофореграммам глиадинов различаются более 95 % сортов пшеницы). Электрофоретические спектры этих белков не зависят ни от условий выращивания растений, ни от условий и длительности хранения семян. Эти белки появляются в эндосперме на 11-й день после оплодотворения и сохраняются минимум в течение трех суток после прорастания зерновки.

Электрофоретический анализ запасных белков включает следующие **этапы**:

- 1) выделение проламинов;

- 2) приготовление геля для электрофореза;

- 3) проведение электрофореза;

- 4) фиксация и окрашивание;
- 5) идентификации компонентов электрофоретического спектра.

Проламины извлекают из эндосперма отдельных зерновок и тщательно их измельчают. Глиадин пшеницы экстрагируют 5М раствором мочевины, гордеин ячменя – 6М раствором мочевины. Время экстракции составляет 2 ч при комнатной температуре, но для удобства выделения белка ее проводят в течение ночи на холод.

В настоящее время для электрофореза используют полиакриламидный гель (ПААГ), имеющий ряд преимуществ. Он прозрачен, химически стабилен, инертен, устойчив к изменениям pH и температуры, нерастворим в большинстве растворителей, и, наконец, в нем практически отсутствуют адсорбция и электроосмос.

Для приготовления 100 мл раствора требуется:

- 24 г мочевины;
- 30 мл ледяной уксусной кислоты;
- 6,5 г акриламида;
- 0,17 г бисакриламида;
- 0,32 г персульфата аммония;
- 0,5 мл ТЕМЕДа.

С увеличением концентрации акриламида в геле эффективный размер пор уменьшается. Эффективный размер пор геля определяет его сопротивление к перемещению макромолекул. При высоких концентрациях акриламида гель становится более ломким и трудным в обращении. С уменьшением размера пор геля уменьшается скорость перемещения белка через гель. Регулируя размер пор геля путем изменения концентрации акриламида, можно оптимизировать разрешающую способность метода для конкретного анализируемого образца. Таким образом, физическое состояние ПААГ характеризуется по составу акриламида и бисакриламида.

Приготовленный раствор заливают в кассеты прибора для электрофореза и помещают в термостат для полимеризации геля.

Прибор для электрофореза (рис. 1) состоит из:

- 1) источника постоянного тока с регулируемым напряжением и со стабилизатором напряжения;

- 2) камеры для электрофореза, служащей для размещения кассеты (пластинки или трубки геля) и поддержания постоянных условий проведения анализа. Камера обычно имеет прямоугольную форму, изготовлена из стекла или твердой пластмассы с двумя изолированными буферными резервуарами (анодным и катодным), содержащими раствор электролита. В каждый резервуар погружен электрод, подключенный к

соответствующему полюсу источника тока. Должен поддерживаться одинаковый уровень электролитов в резервуарах, чтобы предотвратить поток жидкости и гидростатическое давление на гель. Камера для электрофореза оснащена крышкой, которая предотвращает испарение растворителей и обеспечивает равномерно насыщенную влагой атмосферу во время всего процесса. Предпочтительно использование предохранителя для отключения электропитания, когда крышка камеры снята. Если мощность тока, приложенного к электрофоретической пластинке, превышает 10 Вт, то рекомендуется применять охлаждение камеры.

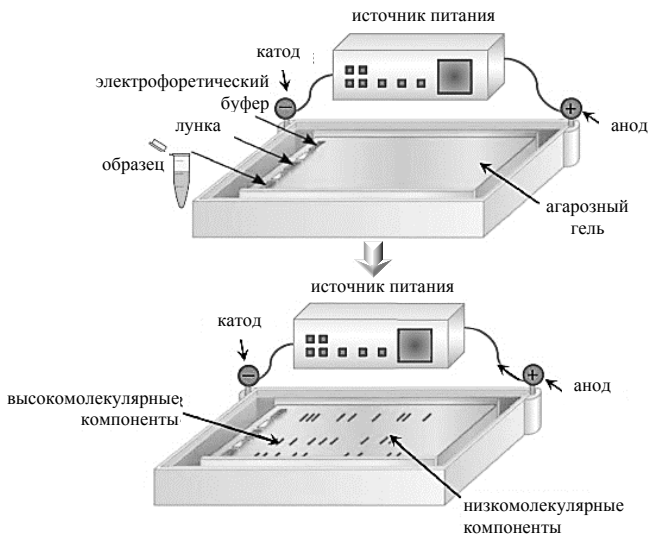


Рис. 1. Прибор для электрофореза

3) устройства для заливки геля, представляющего собой стеклянную трубку, стеклянную пластину или пару прямоугольных пластин (ячейку), служащих для формирования поддерживающей среды, в которой непосредственно проводится процесс электрофоретического разделения. Пластины могут быть расположены в камере вертикально или горизонтально и должны быть погружены или иметь контакт посредством фитилей с катодным и анодным изолированными буферными резервуарами, содержащими раствор электролита. Преимуществом пластин для проведения процесса является возможность сравнения образцов в одной общей ячейке геля, что более информативно по сравнению

с набором гелей из ряда трубок. Преимущество горизонтальных пластин по сравнению с вертикальными заключается в отсутствии проблемы герметизации швов, а недостаток – в большой поверхности контакта с воздухом и, соответственно, риске испарения жидкости.

Перед заливкой геля основание и боковые стороны ячейки закрывают подходящими прокладками, толщина которых определяет толщину рабочего геля. Заливку растворов проводят таким образом, чтобы исключить попадание внутрь ячейки пузырьков воздуха.

Гребенку, имеющую зубцы соответствующего размера, устанавливают в верхнюю часть ячейки на разделяющий гель и оставляют там до окончания полимеризации геля. Формирование геля обычно занимает не менее 30 мин и может считаться законченным, когда между гелем и водным слоем появляется четкая граница. После удаления гребенки из геля, прошедшего полимеризацию, остается ряд лунок.

Заполняют нижний и верхний резервуары камеры предписанным электродным буферным раствором. Готовят испытуемый и стандартный растворы, содержащие краситель и сахарозу или другой плотный и вязкий растворитель. Наносят образцы шприцем или микропипеткой в основания лунок, сразу включают электрический ток и начинают электрофорез, соблюдая предписанные условия (температуру и величину напряжения).

В прибор для электрофореза подается постоянный ток, и под действием электрического поля молекулы белка в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении анода (+) или катода (-). В нейтральных или слабощелочных буферах, которые чаще всего используются для электрофореза, большинство белков, ионизируясь, приобретают положительный суммарный заряд и поэтому двигаются в сторону анода.

Белковые молекулы, в зависимости от величины заряда и размеров, приобретают разные скорости – в этом и состоит ***сущность процесса электрофореза.***

Постепенно исходный препарат, состоявший из смеси различных белков, разделяется на зоны – *компоненты*, мигрирующих с одной и той же скоростью.

В ходе электрофореза компоненты остаются невидимыми, поэтому для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, который тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны.

Когда окрашенная зона достигает нижней границы пластины или трубки, ток выключают, пластину удаляют из камеры.

Разделившиеся зоны во избежание их диффузии (размывания полос) фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и вымачивают в специальной смеси: кислоты выпадают в осадок в том месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза.

После фиксации (или одновременно с ней) проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком. В результате реакции краситель окисляется и превращается в формазан – ярко окрашенное вещество, находящееся непосредственно в месте прохождения ферментативной реакции, а сам гель остается прозрачным.

Вместо окрашивания или наряду с ним часто используют методы обнаружения разделенных зон по их радиоактивности:

- приемы регистрации полос на фотопленке посредством автордиографии или флюорографии;
- способы счета радиоактивности в геле с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

После окрашивания, получают **электрофореграмму** – полосу геля, на которой расположены выявленные для отдельных особей фракции изоферментов.

2.2. Интерпретация электрофореграмм и составление белковых формул

На основе электрофоретических спектров запасных белков в 1967 г. в ВИРе В. Г. Конарев и сотрудники разработали и внедрили систему идентификации и паспортизации мировых генетических ресурсов растений. В основу системы положен **принцип эталонного спектра культуры**, который формируется по результатам изучения внутривидовой изменчивости соответствующего маркерного белка в мировой коллекции.

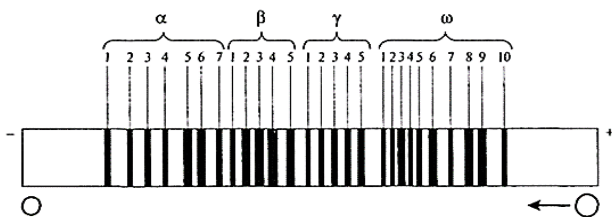


Рис. 2. Эталонный спектр проламина

В основе идентификации компонентов электрофоретического спектра глиаина пшеницы, гордеина ячменя и составления сортовых формул лежит *эталонный спектр проламина* (см. рис. 2).

Эталонный спектр составлен на основе сравнительного изучения электрофоретических спектров глиаина большого числа сортов и биотипов пшеницы и ее сородичей.

Он содержит 29 основных позиций, распределенных по 4 фракциям (рис. 3).

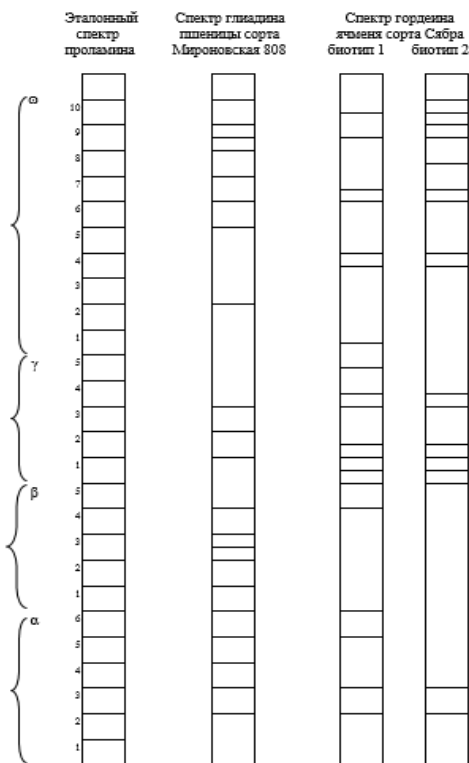


Рис. 3. Спектры глиаина пшеницы, гордеина ячменя в виде белковых формул по эталонному спектру проламина

Сортовым признаком в спектре является и относительная интенсивность компонентов.

В формулах проламина интенсивные компоненты подчеркивают, слабые отмечают чертой над номером позиции, очень слабые (следы полос) – двумя чертами.

Используя эталонный спектр, составленный для культуры, можно записать спектр любого сорта, биотипа, образца в виде так называемых белковых формул. Таким образом, **белковый спектр** – это своеобразный идентификатор сорта, по которому его можно распознавать.

К настоящему времени в виде белковых формул зарегистрировано более 5000 образцов пшеницы, ячменя, овса из коллекции ВИР; составлено 20 каталогов белковых формул, в т. ч. 7 в электронном виде.

3. ДОКУМЕНТАЦИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ПРИ ЛАБОРАТОРНОМ СОРТОВОМ КОНТРОЛЕ

Результаты, полученные при проведении электрофоретического анализа контрольных проб, сравниваются с результатами, полученными при проведении электрофоретического анализа семян стандартных образцов соответствующих сортов сельскохозяйственных растений.

По итогам проведенного сравнения определяется сортовая чистота или сортовая типичность анализируемых партий сельскохозяйственных растений.

По результатам лабораторного сортового контроля сельскохозяйственных растений оформляется *протокол испытаний* в двух экземплярах:

- один экземпляр протокола испытаний передается заявителю;
- второй – остается в организации, проводившей лабораторный сортовой контроль.

Сведения, включенные в протокол испытаний, вносятся в акт апробации сельскохозяйственных растений.