

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОТБОРА НА ВЫСОКОЕ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В СЕМЕНАХ ГРЕЧИХИ

**С.В. БОБКОВ**, кандидат сельскохозяйственных наук  
**В.И. ЗОТИКОВ**, доктор сельскохозяйственных наук, член-корр. РАН  
**И.М. МИХАЙЛОВА**, научный сотрудник

ФГБНУ «ФНЦ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР»  
E-mail: svbobkov@gmail.com

*Запасные белки гречихи отличаются гармоничным составом аминокислот, занимая промежуточное положение между зернобобовыми и злаковыми культурами. Селекция гречихи на высокое содержание белка в семенах ранее не проводилась по причине отсутствия четких критериев отбора. Существенные различия по содержанию белка между зародышем (48,3-52,5 %) и эндоспермом (5,7-6,1 %) делают возможным проведение отбора по высокой доле зародыша в семени. В статье обсуждаются методические вопросы использования признака «высокая доля зародыша в семени» в селекции гречихи на высокое содержание белка и приведены результаты изучения сортов гречихи по величине этого признака. Из изученного набора сортов наибольшими величинами массы зародыша и доли зародыша в семени отличались сорта Батыр, Богатырь, Дизайн. Установлено независимое изменение массы зародыша и эндосперма, что облегчает использование признака «высокая доля зародыша в семени» в селекционном процессе. Наиболее подходящими для использования в селекции на высокое содержание белка являются сорта гречихи Батыр и Богатырь, характеризующиеся низким содержанием эндосперма и высокой долей зародыша в семени.*

**Ключевые слова:** гречиха, *Fagopyrum esculentum* Moench, селекция, отбор, белок, зародыш, эндосперм, высокая доля зародыша в семени.

В России гречиха является важной сельскохозяйственной культурой. В 2017 году гречиху выращивали на площади 1,5 млн. га и получили 1,52 млн тонн зерна, урожайность зерна этой культуры составила 1,02 т/га (FAOSTAT, 2019) [1].

Гречиха является источником высококачественного белка, который характеризуется сбалансированным составом незаменимых аминокислот [2]. В сравнении со злаковыми культурами, белок гречихи содержит больше лизина, аргинина и аспарагиновой кислоты, но меньше пролина и глутаминовой кислоты [3]. Взаимное дополнение состава аминокислот позволяет использовать зерно гречихи для улучшения аминокислотного баланса продуктов переработки злаковых культур.

В зависимости от сорта гречихи содержание белка в муке варьирует от 8,5% до 18,9% [4]. Гречиха в среднем содержит больше белка, чем рис, пшеница, просо, сорго и кукуруза, но меньше, чем овёс. В белке гречихи содержится 12,5-18,2% альбуминов, 43,3-64,5 % глобулинов, 0,8-2,9% проламинов, 8,0-22,7% глутелинов и 15% других белков [5, 6, 7]. Другие авторы приводят более высокое (6,24%) содержание проламинов [8], указывая на то, что среди них отсутствуют иммуноактивные белки с молекулярной массой 30 кДа, провоцирующие развитие целиакии. Присутствующие в семенах гречихи фагопиритолы предохраняют белки от деградации в течение длительного периода времени [9, 10].

Традиционная селекция гречихи направлена на повышение урожайности и технологических качеств зерна, обеспечивающих наибольший выход крупы-ядрицы при переработке [11, 12]. Диверсификация использования семян этой культуры для нужд глубокой переработки предъявляет свои требования к селекционной работе, которую можно проводить

в направлении создания сортов с высоким содержанием белка, энзимрезистентного крахмала, ненасыщенных жирных кислот, флавоноидов, фагопиритолов, фитостеролов и других биологически активных веществ, пригодных для промышленной переработки. Основываясь на высокой ценности белков гречихи, весьма актуальными являются исследования, создающие базу для селекции на высокое содержание белка в семенах. Разработка методов получения белковых изолятов гречихи подтверждает необходимость создания высокобелковых сортов гречихи [13].

Органы семени гречихи заметно различаются по содержанию белка. В перикарпе его содержание составляет 4% [14], в эндосперме - 5,7-6,1%, а в зародыше - 48,3-52,5% [13]. Наши исследования показали, что доля зародыша в обрушенном семени гречихи варьирует от 23,3 до 27,8%. Учитывая существенный вклад зародыша (72,5-75,9%) в накопление белков в семенах, предложено использовать признак «содержание зародыша в семени» в качестве маркера в селекции гречихи на высокое содержание белка [13].

В научной литературе приведены способы оценки и отбора растений зерновых и зернобобовых культур на высокую продуктивность и урожайность с использованием морфофизиологических показателей начального роста [Цит. по 15]. Интересен способ отбора растений гороха на высокую семенную продуктивность по отношению длины корня к высоте стебля у 11-суточных растений, позволяющий сохранять выделенные растения и доращивать их до созревания [15]. Селекция гречихи на высокое содержание белка в семенах ранее не проводилась по причине отсутствия четких критериев отбора. Поэтому цель исследования состояла в разработке метода отбора гречихи по признаку «высокая доля зародыша в семени» для использования в селекции на высокое содержание белка и оценке различных сортов этой культуры в качестве потенциальных доноров ценных аллелей.

#### **Материал и методы**

Определение содержания эндосперма и зародыша, а также процентного содержания зародыша в обрушенном семени, проводили в семенах сортов гречихи Девятка, Батыр, Башкирская красностебельная, Богатырь, Деметра, Дизайн, Дикуль, Дождик, Дружина, Чатыр Тау. Анализировали 30 обрушенных семян каждого сорта гречихи.

**Оценка генотипов гречихи по содержанию зародыша и эндосперма в семени (методика 1).** Обрушенные семена гречихи замачивали в чашках Петри в течение 1 суток в водопроводной воде. Проклюнувшиеся семена с помощью препаровальной иглы разделяли на эндосперм и зародыш. Органы семени высушивали в течение суток до воздушно-сухого состояния (14% влажности) и определяли массу. Находили суммарную массу эндосперма и зародыша, вычисляли процентную долю зародыша в семени.

**Отбор жизнеспособных зародышей по высокому содержанию в семени для использования в селекции гречихи на высокое содержание белка (методика 2).** В опыте для разработки методики выделения жизнеспособных зародышей, отобранных по признаку «высокое содержание зародыша в семени», и получения проростков с последующим переносом в почвенную культуру использовали сорт гречихи Девятка. Обрушенные семена гречихи взвешивали и проращивали в чашках Петри между листами фильтровальной бумаги, смоченными водопроводной водой. Зародыши с длиной проростка 3 мм изолировали из семян и помещали в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой, которая предварительно была разделена на сектора. Эндосперм высушивали до воздушно-сухого состояния (14% влажности). Определяли массу обрушенного зерна, массу высушенного эндосперма, расчетную массу зародыша и % зародыша в семени. В почву высаживали проросшие зародыши с долей в семени более 38%.

Анализ экспериментальных данных на соответствие нормальному распределению проводили по критерию Шапиро-Уилкса. Однородность дисперсий, необходимую для корректного сравнения экспериментальных данных, оценивали по критерию Левена. Статистическую обработку данных по массе зародыша и эндосперма, доле зародыша в семени проводили методом однофакторного дисперсионного анализа. Сравнения средних проводили с использованием критерия HSD Тьюки ( $\alpha=0,05$ ). Для оценки связей между признаками

использовали методы параметрического корреляционного анализа Пирсона и непараметрических ранговых корреляций Спирмена. Оценку эффективности метода выделения жизнеспособных зародышей (метод 2) проводили по признакам «масса зародыша», «масса эндосперма», «масса семени» с использованием критерия Стьюдента (t-тест).

### Результаты и обсуждение

Определить массовую долю зародыша в семени можно в результате выделения зародыша и эндосперма из семени с последующим взвешиванием (Материал и методы, методика 1). При этом, определение массы органов семени связано с высушиванием, что является критическим моментом для его проращивания. Для отбора растений гречихи по признаку «высокая доля зародыша в семени» использовали оригинальную методику 2 (Материал и методы), позволяющую получать и проращивать жизнеспособные зародыши гречихи. При использовании первой методики определяли массу изолированного зародыша и эндосперма, а массу семени находили в результате суммирования полученных величин. Согласно второй методике вначале находили массу семени, а затем изолировали зародыш и эндосперм. В отличие от методики 1 высушивали только эндосперм, а массу зародыша вычисляли как разность между массой семени и массой эндосперма.

Важность оценки отбора по признаку «высокая доля зародыша в семени» при изолировании жизнеспособных зародышей по методике 2 требует проведения сравнений с методикой 1. Для выделения зародышей использовали обрушенные семена сорта гречихи Девятка. Сравнение методик проводили по признакам «масса зародыша», «масса эндосперма», «масса семени» с использованием критерия Стьюдента (t-тест). Следует обратить внимание, что только массу эндосперма в обеих методиках определяли одним способом, а способы определения массы зародыша и семени различались.

Как и следовало ожидать, средняя масса эндосперма, изолированного с использованием методик 1 и 2, практически не различалась и составляла 0,021 0,023 г соответственно (табл. 1). Оценка по критерию Стьюдента не выявила существенных различий между средними ( $p=0,135712$ ).

Таблица 1

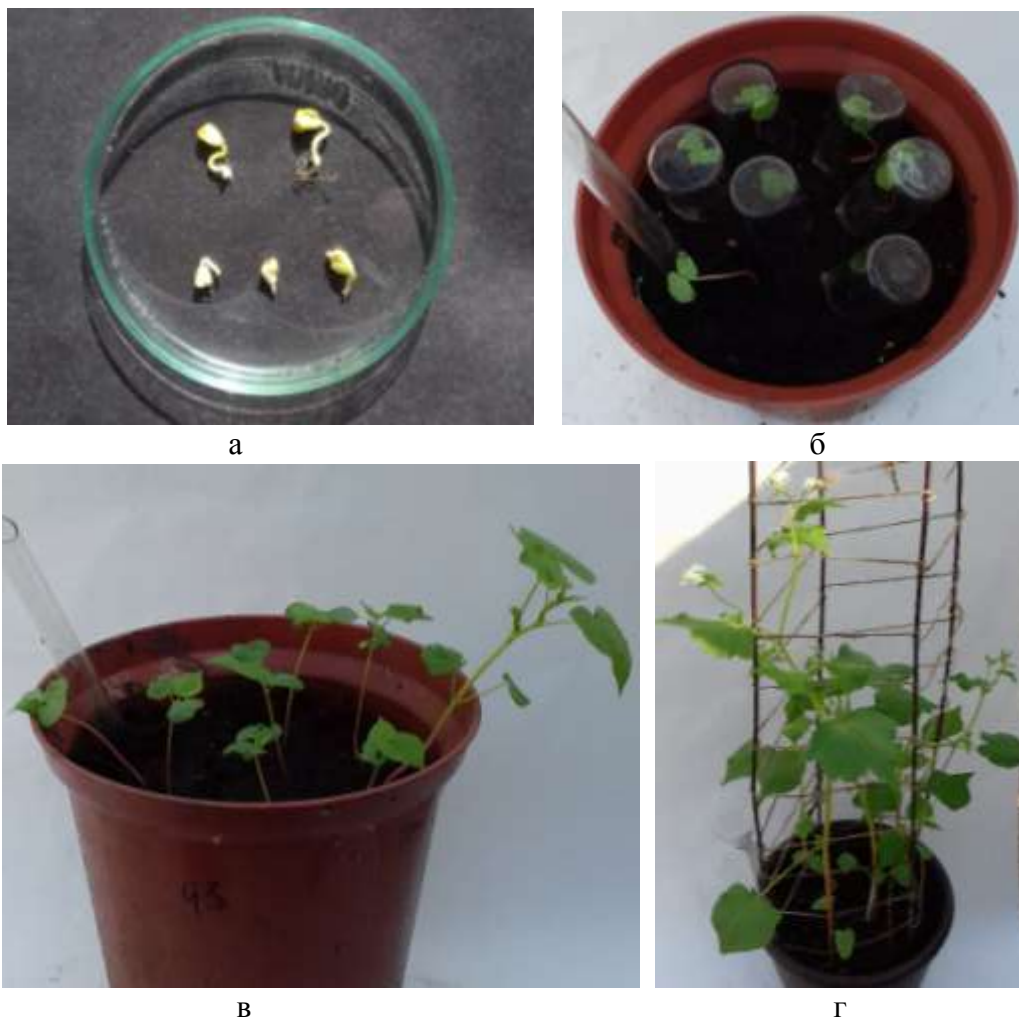
**Сравнение методов выделения зародышей,  $N_1=N_2=35$**

Признак	Метод		t-тест, p
	1	2	
Масса зародыша, г	0,008083	0,007789	0,306171
Масса эндосперма, г	0,020966	0,022580	0,135712
Масса семени, г	0,029049	0,030369	0,274469

Средняя масса зародыша при применении методик 1 и 2 также существенно не различалась ( $p=0,306171$ ) и составила 0,008 и 0,0078 г соответственно, не наблюдалось существенных различий ( $p=0,135712$ ) по величине средней массы семени, которая равнялась 0,029 и 0,03 г соответственно.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о соответствии прямого и расчетного методов оценки массы зародыша и возможности отбора жизнеспособных зародышей гречихи для использования в селекции на высокое содержание белка.

Зародыши гречихи, изолированные в соответствии с методикой 2, проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге с маркированными секторами для последующего отбора на высокую долю в семени по результатам взвешивания эндосперма. Отобранные по признаку «высокая доля зародыша в семени» проростки (рисунок) высаживали в полипропиленовые сосуды с почвой.



*Рис. Выращивание растений из зародышей с высокой долей в семени, изолированных из семян сорта гречихи Девятка: а) отобранные для перевода в почву проростки изолированных зародышей, б) адаптация проростков к почвенной культуре, в) адаптированные растения гречихи, г) растение гречихи в фазе начала цветения*

Адаптированные к почвенной культуре растения гречихи цвели и давали урожай семян. Таким образом, выявленная ими способность изолированных зародышей гречихи прорасти на фильтровальной бумаге, смоченной водопроводной водой, адаптироваться к почвенной культуре, вырасти в хорошо развитые растения и формировать семена является необходимым условием для селекции на высокое содержание белка в семенах.

Гибридизация является важным инструментом переноса ценных аллелей, поэтому исследование полиморфизма сортов гречихи по содержанию зародыша в семени служит необходимым этапом для проведения селекции на высокое содержание белка. Определение содержания эндосперма и зародыша, а также процентного содержания зародыша в обрубленном семени проводили согласно методике 1 (Материал и методы) в семенах сортов Батыр, Башкирская красностебельная, Богатырь, Деметра, Дизайн, Диккуль, Дружина, Дождик, Чатыр Тау. Анализ массы зародыша, массы эндосперма и процентной доли зародыша у семян гречихи по критерию Шапиро-Уилкса выявил соответствие нормальному распределению ( $p=0,06-0,85$ ;  $0,08-0,99$ ;  $0,2-0,92$  соответственно). У всех исследованных сортов гречихи выявлена однородность дисперсий по массе эндосперма, сумме зародыша и эндосперма, и по процентной доле зародыша в семени (Тест Левена,  $p=0,741480$ ;  $p=0,668095$ ;  $p=0,170557$  соответственно), что служило основанием для статистически корректного сравнения средних значений признаков и проведения однофакторного дисперсионного анализа.

Суммарная масса (зародыш и эндосперм) обрубленного семени у изученных сортов гречихи составила 0,0224-0,0279 г, наиболее крупноплодными являлись сорта Дождик, Чатыр Тау и Дизайн с величинами признака 0,0261, 0,0269 и 0,0279 г соответственно (табл. 2).

Таблица 2

**Масса органов и доля зародыша в обрубленных семенах сортов гречихи**

№ п/п	Сорт	Масса органов семени гречихи, г			Доля зародыша в семени, %
		зародыш	эндосперм	Σ	
1	Башкирская красностебельная	0,00513 <sup>a</sup>	0,017297 <sup>a</sup>	0,022427 <sup>a</sup>	23,1195 <sup>a</sup>
2	Дикуль	0,00545 <sup>ab</sup>	0,018363 <sup>ab</sup>	0,023813 <sup>ab</sup>	23,07583 <sup>a</sup>
3	Деметра	0,00557 <sup>ab</sup>	0,019233 <sup>ab</sup>	0,024803 <sup>abc</sup>	22,67709 <sup>a</sup>
4	Дружина	0,006 <sup>bf</sup>	0,019587 <sup>ab</sup>	0,025587 <sup>abc</sup>	23,55079 <sup>a</sup>
5	Чатыр Тау	0,006587 <sup>cf</sup>	0,020337 <sup>b</sup>	0,026923 <sup>c</sup>	24,6975 <sup>ac</sup>
6	Дождик	0,006827 <sup>cd</sup>	0,019253 <sup>ab</sup>	0,026080 <sup>c</sup>	26,47122 <sup>cd</sup>
7	Батыр	0,00712 <sup>cde</sup>	0,017267 <sup>a</sup>	0,024387 <sup>ab</sup>	29,54368 <sup>b</sup>
8	Богатырь	0,007377 <sup>de</sup>	0,017473 <sup>a</sup>	0,024850 <sup>abc</sup>	29,91375 <sup>b</sup>
9	Дизайн	0,007663 <sup>e</sup>	0,020287 <sup>b</sup>	0,027950 <sup>c</sup>	27,90593 <sup>bd</sup>

\* Сравнения средних проводили с использование критерия HSD Тьюки ( $\alpha=0,05$ ), наличие одинаковых индексов у группы сортов свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий.

Интервал средних значений массы зародыша составил 0,0051-0,0077 г, наибольшей массой зародыша отличались сорта Батыр, Богатырь, Дизайн (0,0071, 0,0074, 0,0077 г соответственно). Средняя масса эндосперма укладывалась в интервал 0,0173-0,0203 г, наибольшее значение этого признака отмечено у сортов Дизайн и Чатыр Тау (0,02 г). Диапазон изменчивости по доле зародыша у сортов гречихи составил 22,7-29,9%, наибольшая величина этого признака характерна для семян сортов Дизайн, Батыр и Богатырь (27,9; 29,5 и 29,9% соответственно).

С использованием различных методов (Пирсона и ранговых корреляций Спирмена) определены корреляционные связи между признаками «масса зародыша», «масса эндосперма», «суммарная масса семени», «доля зародыша в семени» (табл. 3).

Таблица 3

**Корреляции между массой зародыша, эндосперма, суммарной массой семени и долей зародыша в семени гречихи**

Признак	Масса зародыша, г	Масса эндосперма, г	Суммарная масса семени (зародыш и эндосперм), г	Доля зародыша в семени, %
<i>Корреляции по Пирсону</i>				
Масса зародыша, г	1			
Масса эндосперма, г	0,3*	1		
Суммарная масса зародыша и эндосперма, г	0,6*	0,96*	1	
Доля зародыша, %	0,6*	-0,5*	-0,2*	1
<i>Ранговые корреляции Спирмена</i>				
Масса зародыша, г	1			
Масса эндосперма, г	0,2	1		
Суммарная масса семени (зародыш и эндосперм), г	0,7*	0,9*	1	
Доля зародыша в семени, %	0,9*	-0,1	0,4	1

\* Корреляции статистически значимы при  $p < 0,05$

Суммарная масса семени гречихи находилась в умеренной зависимости от массы зародыша ( $r_{\text{Пирсон}}=0,6$ ,  $r_{\text{Спирмен}}=0,7$ ;  $p < 0,05$ ) и сильной от массы эндосперма ( $r_{\text{Пирсон}}=0,96$ ,

$r_{\text{Спирмен}}=0,9$ ;  $p<0,05$ ). Доля зародыша в семени в большей степени определялась массой зародыша ( $r_{\text{Пирсон}}=0,6$ ,  $r_{\text{Спирмен}}=0,9$ ;  $p<0,05$ ). При этом, между собой масса эндосперма и масса зародыша изменялись независимо ( $r_{\text{Пирсон}}=0,3$  -  $p<0,05$ ,  $r_{\text{Спирмен}}=0,2$ ), указывая на наличие различных генов-регуляторов. Отсутствие тесной связи между массой зародыша и эндосперма ярко продемонстрировали сорта Батыр и Богатырь, у которых высокая масса зародыша (0,007120 и 0,007377 г соответственно) сочеталась с низкой в сравнении с другими изученными сортами массой эндосперма (0,017267 и 0,017473 г соответственно). Напротив, среди исследуемого набора сортов сорт Дизайн характеризовался наибольшей массой зародыша (0,007663 г) в сочетании с самой большой массой эндосперма (0,020287 г).

#### Заключение

Семена гречихи содержат белок, характеризующийся сбалансированным аминокислотным составом. В связи с этим, повышение содержания белка в семенах гречихи является актуальным направлением селекции. Селекционную работу в этом направлении сдерживает отсутствие четких критериев отбора. Учитывая различия между зародышем и эндоспермом по содержанию белка, признак «высокая доля зародыша в семени» предложено использовать в качестве маркера для отбора растений на высокое содержание белка в семенах гречихи. Предложенный нами способ получения жизнеспособных зародышей гречихи позволяет проводить их отбор по массовой доле в семени, что статистически подтверждено с использованием критерия Стьюдента. Выявленная ими способность зрелых изолированных зародышей гречихи прорасти на фильтровальной бумаге, смоченной водопроводной водой, адаптироваться к почвенной культуре, вырастать в хорошо развитые растения и формировать семена является необходимым условием для селекции на высокое содержание белка. Проведено изучение 9 сортов гречихи по массе зародыша, эндосперма и доле зародыша в семени. Наибольшей массой зародыша и долей зародыша в семени отличались сорта Батыр, Богатырь, Дизайн. Установлено независимое изменение массы зародыша и эндосперма у изученных сортов гречихи, что с успехом можно использовать в селекции на высокую долю зародыша в семени и, соответственно, высокое содержание белка в семенах.

#### Литература

1. Crops // FAOSTAT [Электронный ресурс]. URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (дата обращения: 03.07.2019).
2. Bobkov S. Biochemical and technological properties of buckwheat grains. Chapter 34 // In: M. Zhou, I. Kreft, S.-H. Woo, N. Chrungoo, G. Wieslander (editors) // Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. Oxford: Academic Press, 2016. – P. 423-440.
3. Zhang Z.L., Zhou M.L., Tang Y., Li F.L., Tang Y.X., Shao J.R., Xue W.T., Wu Y.M. Bioactive compounds in functional buckwheat food // Food Res. Int. - 2012. - V. 49. – P. 389-395.
4. Krkoskova B., Mrazova Z. Prophylactic components of buckwheat // Food Research International. - 2005. – V. 38. – P.561-568.
5. Javornik B., Kreft I. Characterization of buckwheat proteins // Fagopyrum. - 1984. – V. 4. – P. 30-38.
6. Ikeda K., Sakaguchi T., Kusano T., Yasumoto K. Endogenous factors affecting protein digestibility in buckwheat // Cereal Chem. - 1991. – V. 68. – P. 424-427.
7. Wei Y., Hu X., Zhang G., Ouyang S. Studies on the amino acid and mineral content of buckwheat protein fractions // Nahrung/Food. - 2003. – V. 2. – P. 114-116.
8. Petr J., Michalík I., Tlaskalová H., Capouchová I., Faměra O., Urminská D., Tučková L., Knoblochová H. Extention of the spectra of plant products for the diet in coeliac disease // Czech J. Food Sci. – 2003. – V. 21. – P. 59-70.
9. Horbowicz M., Brenac P., Obendorf R.L. Fagopyritol B1, O- $\alpha$ -d-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-d-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance // Planta. - 1998. – V. 205. – P. 1-11.
10. Павловская Н.Е., Лазарева Т.Н., Горькова И.В. Влияние сроков хранения на содержание запасных белков в семенах гречихи // Хранение и переработка сельхозсырья. - 2006. - № 3. – С. 12-15.

11. Бобков С.В. Создание исходного материала для селекции интенсивных сортов гречихи на основе комплексного использования мутантных форм // Автореферат кандидатской диссертации. - СПб. - 1993. – 16 с.
12. Варлахова Л.Н., Бобков С.В., Михайлова И.М. Технологические качества зерна гречихи различных сортов // Доклады РАСХН. - 2012. - № 6. - С. 37-40.
13. Бобков С.В., Зотиков В.И., Наумкина Т.С., Сидоренко В.С., Уварова О.В., Михайлова И.М. Перспективы получения изолированных белков гречихи // Земледелие. - 2017. - № 3. - С. 27-30.
14. Pomeranz Y., Robbins G.S. Amino acid composition of buckwheat // J. Agric. Food Chem. - 1972. – V. 20. – P. 270–274.
15. Патент на изобретение № 2031573 RU C1 A01 H1/04. Номер заявки: 5017673/13, 26.08.1991. Дата публикации: 27.03.1995. Способ отбора высокопродуктивных форм гороха / Новикова Н.Е., Лаханов А.П., Антонова Г.А. Заявитель и патентообладатель - Научно-производственное объединение по зернобобовым и крупяным культурам «Орел». – 7 с.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования по пункту программы ФНИ государственных академий 0636-2019-0008 «Мобилизация генетических ресурсов зернобобовых и крупяных культур для использования в селекционном процессе».*

## **ELABORATION OF SELECTION METHOD FOR HIGH PROTEIN CONTENT IN BUCKWHEAT SEEDS**

**S.V. Bobkov, V.I. Zotikov, I.M. Mikhailova**

**FSBSI «FEDERAL SCIENTIFIC CENTER OF LEGUMES AND GROAT CROPS»**

e-mail: svbobkov@gmail.com

**Abstract:** *Buckwheat storage proteins have balanced amine acid composition occupying intermediate position between legume and cereals crops. Breeding of buckwheat for enhanced protein content was not conducted early because of clear selection criteria absence. Significant differences in protein content between embryo (48.3-52.5 %) and endosperm (5.7-6.1 %) (Bobkov et al., 2017) make possible selection on high percentage of embryo in seed for use in buckwheat breeding on enhanced seed protein content. Methodological questions of using the trait “high percentage of embryo in seed” in breeding and study of buckwheat varieties variability on that trait were discussed. Buckwheat varieties Batyr, Bogatyr and Design were characterized by the largest values of “mass of embryo” and “percentage of embryo in seed”. It was determined that mass of embryo and endosperm changed independently enabling feasible use of the trait “high percentage of embryo in seed” in buckwheat breeding. Varieties Batyr and Bogatyr were recommended for use in buckwheat breeding on enhanced protein content because of low endosperm mass and high percent of embryo in seed.*

**Keywords:** buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench, breeding, selection, protein, embryo, endosperm, high percentage of embryo in seed.