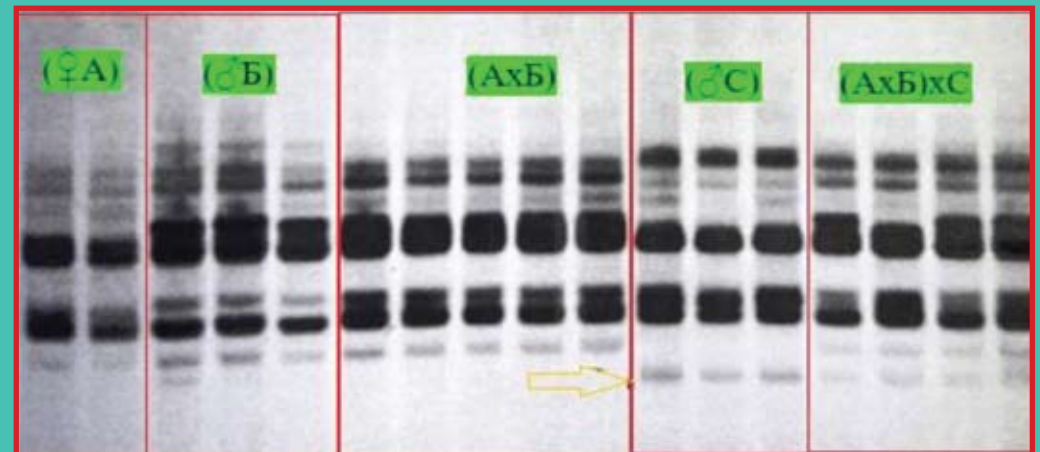


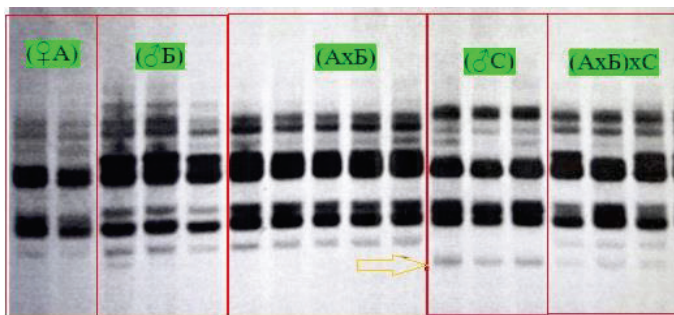
КОНТРОЛЬ ГЕНЕТИЧНОЇ ЧИСТОТИ  
(ОДНОРІДНОСТІ) СОРТІВ  
ПШЕНИЦІ І ЯЧМЕНЮ,  
ТИПОВОСТІ САМОЗАПИЛЕНИХ ЛІНІЙ  
ТА РІВНЯ ГІБРИДНОСТІ ГІБРИДІВ  $F_1$   
КУКУРУДЗИ І СОНЯШНИКУ



НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насінництва  
та сортовивчення

# КОНТРОЛЬ ГЕНЕТИЧНОЇ ЧИСТОТИ (ОДНОРІДНОСТІ) СОРТІВ ПШЕНИЦІ І ЯЧМЕНЮ, ТИПОВОСТІ САМОЗАПИЛЕНИХ ЛІНІЙ ТА РІВНЯ ГІБРИДНОСТІ ГІБРИДІВ $F_1$ КУКУРУДЗИ І СОНЯШНИКУ



Методичні рекомендації

Одеса  
«Астропринт»  
2025

УДК 633.854.78:633.1  
К64

В запропонованих методичних рекомендаціях викладені основні принципи та наведені приклади використання електрофорезу запасних білків насіння при визначенні генетичної чистоти сортів самозапильних культур пшениці та ячменю, типовості самозапильних ліній та рівня гібридності насіння простих і трилінійних гібридів соняшнику та кукурудзи.

Методичні рекомендації розраховані на науковців установ Національної академії аграрних наук, керівників та спеціалістів насінневих компаній та інших сільськогосподарських підприємств різних форм власності.

Автори:

**М. В. Червоніс**, к. с.-г. н., провідний науковий співробітник відділу генетичних основ селекції СГІ–НЦНС;

**О. І. Рибалка**, д. б. н., член-кореспондент НАН та НААН, завідувач відділу генетичних основ селекції СГІ–НЦНС;

**О. М. Благодарова**, наукова співробітниця відділу генетичних основ селекції СГІ–НЦНС;

**А. Є. Солоденко**, к. б. н., старший науковий співробітник, завідувач науково-організаційного відділу СГІ–НЦНС

Відповідальний за випуск:

**В. М. Соколов**, член-кореспондент НААН, директор СГІ–НЦНС

Рецензенти:

**Б. Ф. Вареник**, к. с.-г. н., доцент, с. н. с., завідувач відділу селекції та насінництва перехреснозапильних культур СГІ–НЦНС;

**Є. А. Голуб**, к. с.-г. н., в. о. завідувача відділу селекції та насінництва пшениці СГІ–НЦНС

Розглянуто і затверджено до друку вченою радою Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовищення (*протокол № 6 від 14.08.2025 р.*)

© Селекційно-генетичний інститут —  
Національний центр насіннезнавства  
та сортовивчення (СГІ–НЦНС), 2025

ISBN 978–617–8569–26–6

## ЗМІСТ

Вступ .....	5
1. Суть методу генетичного контролю якості насіння	6
2. Процедура визначення генетичної чистоти насіння сортів, типовості самозапильних ліній та рівня гібридності насіння гібридів F <sub>1</sub> за електрофореграмами запасних білків	7
2.1. Виконання випробувань	7
2.1.1. Відбирання проб	7
2.1.2. Підготовка проби насіння	8
2.1.3. Приготування розчину для дезагрегації запасних білків: гліадину, глютеніну, гордеїну, зеїну, геліантину	8
2.1.4. Приготування поліакриламідного гелю	9
2.1.5. Приготування електродного ацетатного буферу	11
2.1.6. Приготування розчину для фіксації та фарбування білків	11
2.1.7. Підготовка приладу для електрофорезу	11
2.2. Проведення електрофорезу запасних білків	11
2.2.1. Приготування екстракту гліадинів	11
2.2.2. Приготування екстракту глютенінів	12
2.2.3. Приготування екстракту гордеїнів	12
2.2.4. Приготування екстракту зеїнів	13
2.2.5. Приготування екстракту геліантинів	13
2.2.6. Формування гелевих пластин	13
2.2.7. Нанесення розчину білків на гелеву пластину	14
2.2.8. Умови електрофорезу	14
2.2.9. Фарбування гелів	14
2.3. Оформлення результатів	15

## ВСТУП

2.3.1. Оформлення результатів для самозапилених культур	15
2.3.2. Оформлення результатів для перехреснозапилених культур	15
3. Приклади визначення типовості ліній та гібридності насіння F <sub>1</sub> соняшнику за електрофореграмами геліантинів	16
4. Приклади визначення типовості ліній та гібридності насіння F <sub>1</sub> кукурудзи за електрофореграмами зеїнів	21
5. Використання електрофорезу запасних білків пшениці для визначення генетичної чистоти (однорідності) сортів	24
6. Використання електрофорезу гордеїнів для визначення генетичної чистоти (однорідності) сортів ячменю	29
Список літератури	33

Ви вирішили купити, або вже купили сортове насіння пшениці чи ячменю, або ж насіння F<sub>1</sub> гібриду соняшнику чи кукурудзи. Крім посівних якостей вас цікавить рівень генетичної однорідності та/або гібридності цього насіння, який визначатиме урожай на Вашому полі, а для самозапилених культур – перш за все генетична чистота сорту з його унікальними генетично-обумовленими властивостями. Якщо після посіву Ви побачите, що рослини на Вашому полі розрізняються по висоті та іншим ознакам, нерівномірно цвітуть та дозрівають, сподівання на очікуваний високий урожай будуть марними. Це значить, що Ви купили насіння неякісне, що по зовнішнім ознакам ніяк визначити неможливо. Який же вихід?

Гібридне насіння отримують на спеціальних ділянках гібридизації, де висівається близько 80 % рослин так званої материнської лінії і близько 20 % – батьківської. Обидва типи цих ліній значно поступаються за урожайністю гібридам F<sub>1</sub>. Їх призначення – дати гетерозисне насіння, яке на виробничих посівах забезпечить максимально можливі на сьогоднішній день врожаї. Насіння задеклароване продавцем як F<sub>1</sub> буде високоврожайним лише тоді, коли воно отримане з рослин материнської лінії, квітки якої в ідеалі на 100 % будуть запилені пилом батьківської лінії цього гібриду. Згідно міжнародних вимог такого насіння повинно бути не менше 95 % [1]. Досягнути цього досить нелегко навіть в умовах високого рівня селекційної проробки батьківських самозапилених ліній, досконалої техніки та технологічної дисципліни проведення гібридизації, високого рівня культури землеробства. У зв'язку з цим завжди існує загроза отримання на ділянках гібридизації насіння зі значно нижчим ніж 95 % рівнем гібридності, яке однозначно матиме нижчий потенціал урожайності. Використання такого насіння загрожує виробнику суттєвими збитками. Тому насінницькі компанії намагаються перевірити якість насіння заздалегідь до посіву і продати лише партії з високим рівнем гібридності.

Оцінку якості насіння на генетичну чистоту (однорідність) у самозапилених культур і на типовість та гібридність у перехреснозапилених проводять різними методами: польовою апробацією сортових посівів, ґрунтконтролем і лабораторним аналізом. Про оригінальність та сортову чистоту насіння за використання польової апробації та ґрунтконтролю судять за морфологічними ознаками, кількість яких дуже обмежена і до того ж вони не завжди стабільні. Польові методи оцінки є трудомісткими та вимагають значних матеріальних витрат. До того ж точно встановити якість насіння можливо лише в польовому експерименті наступного року або ж взимку в теплицях. В першому випадку експертизу партій насіння до їх реалізації і виробничого посіву взагалі неможливо

провести, перевірка в теплицях ефективний, але, на жаль, дуже вартісний вид контролю якості насіння.

На сьогодні контроль селекційно-насінницьких процесів з використанням методів молекулярно-генетичного маркування став невід'ємною частиною загальної технології робіт у всіх розвинених країнах світу. Одним із найбільш простих і відносно дешевих та ефективних є лабораторний метод ідентифікації насіння за допомогою електрофорезу генетично поліморфних білків різних культур: гліадинів та глютенінів у пшениці, гордеїнів ячменю, зеїнів кукурудзи, геліантинів соняшнику і ін. [2].

Завдяки своїй простоті та високій ефективності метод електрофорезу запасних білків досить широко використовується в різних лабораторіях і є об'єктом стандартизації міжнародних інституцій – ISTA (International Seed Testing Association – Міжнародна асоціація з тестування насіння), UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plant – Міжнародний союз з охорони нових сортів рослин) і ін. [3,4].

Метод електрофорезу запасних білків насіння відпрацьовано і давно використовується у відділі генетичних основ селекції Селекційно-генетичного інституту для контролю типовості самозапильних ліній та рівня гібридності  $F_1$  соняшнику і кукурудзи, а також генетичної чистоти (однорідності) сортів самозапильних культур – пшениці та ячменю.

## 1. СУТЬ МЕТОДУ ГЕНЕТИЧНОГО КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ НАСІННЯ

Електрофорез – це метод розподілу гетерогенної суміші різноманітних молекул білку рослинної клітини, який базується на двох основних принципах: по перше, заряджені молекули білка рухаються в полі постійного електричного струму, де швидкість руху залежить від величини заряду молекули; по друге, ефект молекулярного сита – поліакриламідний гель має пористу структуру і тому в гелі поліпептиди з великою молекулярною масою будуть рухатися повільніше поліпептидів з меншою молекулярною масою. Таким чином, суміш білків може бути розділена в гелі на окремі зони в залежності від заряду та розміру їх молекул. Після електрофоретичного розподілу гетерогенна суміш білків може бути візуалізована на електрофоретичному спектрі як набір окремих рисок, чого використовують різні методи фарбування. Кожна самозапильна лінія або сорт ідентифікується, бо відрізняється від інших як по кількості рисок в спектрі, так і по характеру їх розміщення.

Для перехреснозапильних культур соняшнику та кукурудзи одним із головних постулатів стало відкриття того, що на біохімічному рівні у гетерозиготі завжди функціонують обидва алеля [5]. Тобто, гібридною насінною першого

покоління можна вважати тільки ту, на електрофореграмі того чи іншого білка якої одночасно будуть присутніми всі білкові компоненти материнської та батьківської ліній. Необхідними умовами для визначення гібридності є те, щоб білки вихідних ліній гібриду відрізнялись між собою за алельним станом хоч би одного локусу і щоб на електрофореграмі білків насіння гібриду можна було ідентифікувати хоч би один компонент батьківської лінії. Ця схема буде безвідмовно працювати лише тоді, коли всі локуси у лінії будуть знаходитися у гомозиготному стані.

Знаючи тип електрофоретичного спектру по білках насіння, складається так званий еталон для кожної самозапильної лінії, який не залежить від умов вирощування і відображає лише генетичну конфігурацію самозапильної лінії по генах, які контролюють синтез відповідних білків.

В запропонованих методичних вказівках викладені основні варіанти, що охоплюють практично всі випадки при визначенні генетичної чистоти (однорідності) сортів самозапильних культур, а також типовості самозапильних ліній та рівня гібридності насіння простих і трилінійних гібридів соняшнику та кукурудзи.

## 2. ПРОЦЕДУРА ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ЧИСТОТИ НАСІННЯ СОРТІВ, ТИПОВОСТІ САМОЗАПИЛЕНИХ ЛІНІЙ ТА РІВНЯ ГІБРИДНОСТІ НАСІННЯ ГІБРИДІВ $F_1$ ЗА ЕЛЕКТРОФЕРЕГРАМАМИ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ

### 2.1. Виконання випробувань

#### 2.1.1. Відбирання проб

Методика відбору з поля середньої проби початків кукурудзи чи корзинок соняшнику базується на польовій апробації. Проте, відбір середніх проб для електрофоретичного аналізування дещо відрізняється. Головним завданням методики відбору для визначення типовості чи рівня гібридності є точний та об'єктивний контроль процесу запилення на ділянці. Оскільки окремі фертильні рослини здатні запилювати інші рослини в радіусі до 200 м, то кількість точок відбору, виходячи із площі ділянки гібридизації до 100 га, може бути обмежено 10 точками. Проби відбирають по діагоналі, в кожній точці відбирають корзинки чи початки з кожного ряду материнської форми, облущують насіння і формують об'єднану середню пробу. Від партій насіння обмолоченої кукурудзи чи соняшнику, а також пшениці та ячменю - проби для аналізування відбирають згідно з ДСТУ 4138, а з неї виділяють робочу пробу [6].

Вибірка насіння для аналізування залежить від конкретного завдання. ISTA рекомендує використовувати для простої перевірки ідентичності партії насіння

заявленому сорту чи гібриду вибірку із 50 насінин, а для визначення типовості самозапильних ліній, рівня гібридності F<sub>1</sub> чи генетичної чистоти сорту вибірка має складати не менше 100 насінин. У випадку аналізування потрійних гібридів соняшнику чи кукурудзи для більшої точності вибірку слід збільшити до 200 насінин [3].

#### 2.1.2. Підготовка проби насіння

Кожну зернівку пшениці або ячменю, насінину кукурудзи чи соняшнику окремо подрібнюють за допомогою ударного пристрою плунжерного типу кількома послідовними ударами сталевого стержня. Частину подрібненої насінини кукурудзи із зародком відкидають, а для інших культур використовують весь отриманий шрот, який далі переносять у індивідуальні центрифужні пробірки об'ємом 1,5-2,0 см<sup>3</sup>.

2.1.3. Приготування розчину для дезагрегації запасних білків: гліадинів, глютенінів, гордеїнів, зеїнів, геліантинів

Розчин для дезагрегації запасних білків пшениці (гліадинів та глютенінів) і ячменю (гордеїнів) готують з компонентів згідно з таблицею 1, а розчин для дезагрегації запасних білків кукурудзи (зеїнів) і соняшнику (геліантинів) готують з компонентів згідно з таблицею 2.

Таблиця 1

Склад компонентів дезагрегуючого розчину запасних білків пшениці та ячменю

Реактиви	Одиниця виміру	пшениця		ячмінь
		гліадини	глютеніни	
Кислота оцтова льодяна	мл	45	30	60
Сечовина	г	570	180	480
Цукроза	г	-	200	200
Піронін Y	мг	20	100	100
2-меркаптоетанол	г	-	50	50
Вода дистильована	мл	до 1000	до 1000	до 1000

У колбу ємністю 1000 см<sup>3</sup> наливають невелику кількість дистильованої води і додають оцтову кислоту, а потім сечовину. З метою повного розчинення сечовини колбу поміщають у водяну баню. Після цього вміст колби фільтрують через ватний фільтр у мірний циліндр і додають розчин піроніну Y (100 мг реактиву розчиняють 100 мл дистильованої води), додають 2-меркаптоетанол (якщо необхідно), доводять об'єм водою до 1000 мл.

Розчин для дезагрегації можна використовувати відразу після охолодження до кімнатної температури. Допускається зберігати готові розчини протягом декількох днів.

Таблиця 2

Склад компонентів дезагрегуючого розчину запасних білків кукурудзи та соняшнику

Реактиви	Одиниця виміру	Кукурудза	Соняшник
Кислота оцтова льодяна	мл	60	30
Сечовина	г	480	570
Піронін Y	мг	100	100
2-меркаптоетанол	г	50	-
Вода дистильована	мл	до 1000	до 1000

Для аналізування насіння кукурудзи до суміші компонентів додають 50 мл 2-меркаптоетанолу. Розчин для дезагрегації геліантину залишають в ексикаторі на 8-10 годин, а розчин для дезагрегації зеїну можна використовувати одразу після охолодження до кімнатної температури. Допускається зберігати готові розчини протягом декількох днів.

#### 2.1.4. Приготування поліакриламідного гелю

Поліакриламідний гелю для електрофорезу гліадину, глютеніну та гордеїну, а також зеїну та геліантину готують із компонентів згідно з таблицями 3 та 4.

У колбу ємністю 100 см<sup>3</sup> з невеликою кількістю дистильованої води наливають необхідний об'єм оцтової кислоти, додають метилен-біс-акриламід, акриламід та сечовину. За допомогою магнітної мішалки складові частини гелю розчиняють на водяній бані (кінцева температура повинна становити 35-45 °C).

Після повного розчинення розчин фільтрують у мірний циліндр і доводять кінцевий об'єм дистильованою водою до 83,7 мл. Для попередження передчасної полімеризації гелю розчин необхідно охолодити. Перед додаванням каталізаторів полімеризації рекомендується деаерація розчину акриламідів шляхом його вакуумування протягом 5 хвилин.

Профільтрований розчин виливають у стакан місткістю 250 см<sup>3</sup> і охолоджують до кімнатної температури, після чого додають ТЕМЕД, водні розчини гліцину, аскорбінової кислоти, семиводневого закисного сірчанокислого заліза і надсірчанокислого калію. Останній додають безпосередньо перед формуванням гелевих пластин, полімеризація яких відбувається за 30-40 сек.

Таблиця 3

Склад компонентів поліакриламідного гелю для електрофорезного розділення гліадину і глютеніну та гордеїну

Реактиви	Одиниця виміру	пшениця		ячмінь
		гліадини	глютеніни	
Кислота оцтова льодяна	мл	2,0	2,0	2,0
Метилен-біс-акриламід	г	0,333	0,271	0,413
Акриламід	г	8,0	6,5	10,0
Сечовина	г	48,0	48,0	48,0
Вода дистильована	мл	до 83,7	до 83,7	до 83,7
Водні розчини (катализатори)				
Гліцин (1 %)	мл	10	10	10
Кислота аскорбінова (1 %)	мл	3,3	3,3	3,3
Залізо сірчанокисле закисне семиводне (0,07 %)	мл	1,4	1,4	1,4
Тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД)	мл	0,3	0,2	0,3
Калій надсірчанокислий (2,1 %)	мл	1,4	1,4	1,4
Загальний кінцевий об'єм	мл	100	100	100

Таблиця 4

Склад компонентів поліакриламідного гелю зеїну та геліантину

Реактиви	Одиниця виміру	зеїн	геліантин
Кислота оцтова льодяна	мл	2,0	2,0
Метилен-біс-акриламід	г	0,328	0,55
Акриламід	г	7,5	13
Сечовина	г	48,0	48,0
Вода дистильована	мл	до 83,7	до 83,7
Водні розчини (катализатори)			
Гліцин (1 %)	мл	10	10
Кислота аскорбінова (1 %)	мл	3,3	3,3
Залізо сірчанокисле закисне семиводне (0,07 %)	мл	1,4	1,4
Тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД)	мл	0,2	0,2
Калій надсірчанокислий (2,1 %)	мл	1,4	1,4
Загальний кінцевий об'єм	мл	100	100

### 2.1.5. Приготування електродного ацетатного буфера

Кількість буфера, необхідну для аналізування, розраховують у залежності від об'єму електродної кювети та кількості приладів. Кожен літр буфера повинен містити 0,4 г гліцину і 4 мл льодяної оцтової кислоти.

У колбу відповідної ємності наливають невелику кількість дистильованої води, додають оцтову кислоту та гліцин. Вміст колби перемішують і доводять дистильованою водою до кінцевого об'єму.

Перед використанням буфера необхідно підігріти до температури 35-40 °С.

### 2.1.6. Приготування розчину для фіксації та фарбування білків

У колбу ємністю 1000 см<sup>3</sup> додають 0,2 г порошку фарби кумасі діамантової блакитної R-250, додають 150 мл ацетону (або етанолу) та збовтують. Потім добавляють близько 200 мл дистильованої води і знову збовтують протягом 2-5 хвилин.

Готують 60 % розчин трихлороцтової кислоти, розчиняючи 1 кг кристалічного реактиву в 667 мл дистильованої води.

До суміші компонентів додають 50 мл льодяної оцтової кислоти і 100 мл 60 % розчину трихлороцтової кислоти та знову збовтують. Вміст колби доводять дистильованою водою до об'єму 1000 мл. Перед використанням розчин підігрівають до 40-50 °С.

Фарбу після використання на гелях, на яких білки містять меркаптоетанол, не допускається застосовувати для фарбування глютенінів і геліантинів.

### 2.1.7. Підготовка приладу до електрофорезу

На спейсери приладу наносять тонкий шар нейтрального консистентного мастила (літолу), прикріплюють обидві пари скляних пластин приладу з лінійками до внутрішньої електродної камери приладу, після чого герметизують низ скляних пластин прокладкою з еластичної гуми, для чого низ скла змащують літолом, накривають спочатку смужками целофанової плівки, трохи більшими, ніж скляні пластини, а потім прокладкою і прикручують її гвинтами до приладу.

## 2.2. Проведення електрофорезу запасних білків

### 2.2.1. Приготування екстракту гліадинів

Для отримання розчину гліадину у кожену центрифужну пробірку зі шротом додають 0,25-0,50 мл 70 % етилового спирту. Після цього вміст пробірок інтенсивно перемішують протягом 20-30 секунд на механічній мішалці, потім пробірки розташовують у штативах і залишають за температури 20-25 °С на 60 хвилин для екстракції гліадинів. Далі пробірки центрифугують протягом 10 хвилин при 2000 об/хв. (За відсутності центрифуги спиртовий розчин гліадину

допускається отримувати настоюванням шроту в 70 % спирті протягом 5-6 годин в ексікаторі).

З кожної пробірки автоматичною мікропіпеткою відбирають по 0,2 мл отриманої надосадової рідини і переносять її в чисті сухі центрифужні пробірки. Для отримання розчину гліадину в кожну пробірку додають 0,2 мл дезагрегуючого розчину.

Штатив з пробірками залишають відкритими на 1-5 годин при температурі не нижчою 25 °С для випаровування спирту. Потім їх поміщають в ексікатор. (Отриманий розчин гліадину можна зберігати в ексікаторі протягом 7 днів при температурі не нижче 25 °С).

#### 2.2.2. Приготування екстракту глютенінів

Для отримання розчину глютеніну, вільного від гліадину, виконують попередню виснажуючу екстракцію гліадину. До залишку шроту додають 0,5 мл 70 % етилового спирту. Інтенсивно перемішують на механічній мішалці 20-30 секунд і залишають при температурі 20-25 °С на 40-50 хвилин в ексікаторі. Далі пробірки центрифугують і отриманий супернатант зливають. Екстракцію гліадинів проводять повторно.

Осад відсмоктують вакуумом від залишків спирту. До вмісту пробірки додають 0,5 мл дезагрегуючого розчину глютеніну. Вміст пробірки інтенсивно перемішують механічною мішалкою і залишають в ексікаторі не менше ніж на 8-10 годин (на ніч).

Перед нанесенням в лунки гелю, розчин білка прогрівають 5 хвилин у воді, доведеної до кипіння.

#### 2.2.3. Приготування екстракту гордеїнів

Кожну насінину окремо подрібнюють кількома послідовними ударами сталевого стержня і переносять в центрифужну пробірку. В пробірку додають 0,3-0,5 мл 70 % етилового спирту. Вміст пробірки перемішують 10-20 секунд на механічній мішалці, розташовують в штативах і залишають в ексікаторі при температурі 25-30 °С не менше ніж на 60 хвилин для екстракції гордеїну.

Пробірки центрифугують 5 хвилин при 2000 об/хв. Отриманий супернатант переливають в суху чисту з плоским дном центрифужну пробірку і висушують при температурі не вище ніж 30 °С до повного випаровування спирту.

Після випаровування спирту в кожну пробірку додають 0,2 мкл дезагрегуючого розчину і витримують 1-2 доби в ексікаторі при температурі 25-30 °С.

Перед нанесенням в лунки гелю, розчин білка прогрівають 3 хвилин у воді, доведеної до кипіння.

#### 2.2.4. Приготування екстракту зеїнів

У кожну центрифужну пробірку зі шротом додають 0,5 мл 70 % етилового спирту. Після цього вміст пробірок інтенсивно перемішують протягом 5-10 секунд на механічній мішалці, потім пробірки розташовують у штативах і залишають за температури 20-25 °С на 60 хвилин для екстракції зеїнів. Далі пробірки центрифугують протягом 5 хвилин при 2000 об/хв. За відсутності центрифуги спиртовий розчин зеїну допускається отримувати настоюванням шроту в 70 % спирті протягом 5-6 годин в ексікаторі. З кожної пробірки відбирають по 0,1 мл отриманої надосадової рідини і переносять її в чисті сухі центрифужні пробірки, які поміщають у термостат за температури 40±2 °С до повного висихання спирту. Після повного випаровування спирту сухий залишок (зеїн) в пробірках розчиняють у 150 мкл дезагрегуючого розчину, приготованого раніше і витримують протягом 1-2 діб в ексікаторі за температури 25-30 °С. Перед нанесенням в лунки розчин білка прогрівають протягом 5 хв у воді, доведеної до кипіння.

#### 2.2.5. Приготування екстракту геліантинів

Для екстрагування олії у пробірку додають 0,6 мл підкисленого оцтовою кислотою ацетону (30 мл оцтової кислоти в 1000 мл ацетону). Вміст пробірки інтенсивно перемішують 30-40 секунд на механічній мішалці і залишають для відстоювання уповдовж 15-20 хвилин. Надосадову рідину зливають і відкидають. Дану операцію проводять ще двічі, а потім залишок рідини відсмоктують вакуумним насосом.

До залишку додають 0,3-0,4 мл розчину (для насінин батьківської лінії: 0,20-0,25 мл), 1000 мл якого містять 30 мл оцтової кислоти і 120 г сечовини. Вміст пробірки інтенсивно перемішують за допомогою мішалки і залишають для екстракції геліантинів за кімнатної температури не менше ніж на 30 хвилин. Вміст пробірки центрифугують 10 хвилин при 2000 об/хв. Отриману надосадову рідину зливають в сухі чисті пробірки (бажано з плоским дном) і додають 200 мкл дезагрегуючого розчину. Вміст пробірки з отриманим розчином геліантину залишають в ексікаторі не менше ніж на 8-10 годин. Розчин геліантину в лунки наносять без попереднього прогрівання.

#### 2.2.6. Формування гелевих пластин

Готують прилад для електрофорезу запасних білків. Розчином поліакріламідного гелю швидко заповнюються обидва простори, що утворюються в приладах для електрофорезу між склом, лінійками і прокладкою знизу. Зразу ж в щілину між склом вставляють гребінку для формування лунок.

Щоб зменшити ймовірність руйнування скла під час електрофорезу при підвищенні температури, перед початком роботи з обох боків приладу на 1/5 – 1/8 відкручують обидві верхні потайні шпильки, що утримують скло в приладі. Потім різким рухом висмикують гребінку і, перевернувши прилад, знімають ущільнюючу пластину. Внутрішню електродну камеру приладу вставляють в зовнішню електродну камеру і заливають буферним розчином до рівня, що на 5-6 мм нижчий за верхній рівень зовнішнього скла.

Лунки, утворені зубцями гребінки, звільняють від тонких плівок гелю з допомогою вакуумного насосу, обладнаним вловлювачем рідини з частками гелю.

#### 2.2.7. Нанесення розчину білків на гелеву пластину

Розчин білка за допомогою мікрошприца наносять в окрему лунку гелю. Нанесення білка проводять методом підслоювання, шприц майже торкається поверхні гелю і розчин білка не змішується з буфером. Кількість нанесеного білка залежить від об'єму лунки і коливається в межах від 5 до 25 мкл. Після кожного нанесення зразка в лунку, мікрошприц тричі промивають буферним розчином. Температура під час нанесення зразка має бути не нижчою 18 °С.

Після нанесення проб на один прилад, необхідно поставити на нього кришку з електродами, вирівняти рівень буферу у зовнішній і внутрішній камерах і залишити в такому стані прилад на 5 хвилин.

#### 2.2.8 Умови електрофорезу

Плюс-електрод приладу розміщують у внутрішній електродній камері. Електрофорез виконують за стабільної напруги постійного струму 450-500 вольт. На початку електрофорезу сила струму повинна бути в межах 100 мА і поступово знижується. Температура буферу поступово підвищується і може досягнути 40-45 °С. При перевершенні цієї межі напругу необхідно зменшити.

Тривалість електрофорезу гліадину становить 3,5-4,0 години, глютенінів – 4,5-5,0, зеїнів – 3,5-4,5 години, а для геліантинів – 40 хвилин після того як мітка (смужка, забарвлена піроніном) досягне нижнього краю гелевої пластини.

#### 2.2.9 Фарбування гелів

Після закінчення проводять фарбування гелів в скляних або поліетиленових кюветах протягом 16-17 годин, а для геліантинів соняшнику – 3-3,5 години. Після використання фарбу зливають у посуд для повторного застосування. Гель промивають кількома змінами проточної води.

### 2.3. Оформлення результатів

#### 2.3.1. Оформлення результатів електрофорезу запасних білків самоzapилених культур

Результати аналізів електрофоретичних гелів заносять у протокол установленної форми. Гелі обов'язково документують індивідуально шляхом фотографування і зберігають на випадок арбітражу.

Електрофореграму кожної насінини досліджуваного зразка порівнюють з еталонним спектром (формула згідно каталогу алелів локусів запасних білків) відповідного сорту.

Генетичну чистоту визначають, порівнюючи електрофореграми кожної насінини досліджуваної проби з еталонним спектром. Рівень типовості розраховують за формулою:

$$P_m = T / N \times 100 \quad (1),$$

де:  $P_m$  – рівень типовості, %;

$T$  – кількість насінин з ідентичною до еталону електрофореграмою, шт.;

$N$  – загальна кількість досліджених насінин, шт.

На підставі результатів аналізування замовнику видається "Результат електрофоретичного аналізу типовості насіння за електрофореграмами запасних білків".

#### 2.3.2 Оформлення результатів електрофорезу запасних білків перехреснозапильних культур

Типовість батьківських ліній визначають, порівнюючи електрофореграми кожної насінини досліджуваної проби з еталонним спектром. Рівень типовості розраховують за формулою:

$$P_m = T / N \times 100 \quad (2),$$

де:  $P_m$  – рівень типовості, %;

$T$  – кількість насінин з ідентичною до еталону електрофореграмою, шт.;

$N$  – загальна кількість досліджених насінин, шт.

До гібридних відносять насінини, електрофореграми запасних білків яких ідентичні з електрофореграмами еталону насінин гібриду першого покоління. Рівень гібридності визначають за формулою:

$$P_g = G / N \times 100 \quad (3),$$

де:  $P_g$  – рівень гібридності, %;

$G$  – кількість насінин, ідентичних за електрофореграмою насінинам  $F_1$  еталону, шт.;

$N$  – загальна кількість досліджених насінин, шт.

Рівень гібридності насіння першого покоління  $F_1$  простих модифікованих гібридів визначають за формулою 3, якщо обидві сестринські батьківські лінії

гібриду F<sub>1</sub> за електрофореграмами білків не відрізняються між собою, але мають хоч один додатковий компонент, за яким вони відмінні від електрофореграм білків сестринських ліній материнської форми.

Рівень гібридності насіння першого покоління F<sub>1</sub> трилінійних гібридів визначають за формулою 3 у випадку, коли батьківська лінія трилінійного гібриду на електрофореграмі має хоч один компонент білка, відсутній на електрофореграмі білка обох батьківських ліній простого гібриду, що є материнською формою.

Рівень гібридності насіння трилінійного гібриду у випадку, якщо одна з материнських і батьківська лінії мають хоч один однаковий компонент білка, відсутній на електрофореграмі білка другої материнської лінії простого гібриду, визначають за формулою:

$$P_2 = N - 4n / N \times 100, \quad (4)$$

де: P<sub>2</sub> – рівень гібридності, %;

N – загальна кількість досліджених насінин, шт.

n – кількість насінин без критичного компоненту зеїну або геліантину, шт.

### 3. ПРИКЛАДИ ВИЗНАЧЕННЯ ТИПОВОСТІ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДНОСТІ НАСІННЯ F<sub>1</sub> СОНЯШНИКУ ЗА ЕЛЕКТРОФЕРЕГРАМАМИ ГЕЛІАНТИНІВ

Електрофоретичні компоненти запасних білків насіння соняшнику (геліантину) контролюються як мінімум шістьма локусами: *Hel 1*, *Hel 2*, *Hel 3*, *Hel 4*, *Hel 5*, *Hel 6*. Гени *Hel 1*, *Hel 4* і *Hel 6* є найбільш поліморфними, кожен з яких представлений одним (гомозигота) або двома алелями (гетерозигота). Алелі мають різну рухливість і інтенсивність, що дозволяє ідентифікувати різні серії алельних варіантів по кожному локусу, ідентифікувати гомозиготи по кожному алелю (ознака самозапильних ліній), гетерозиготи (ознака гібридності). Алелі кожного локусу розташовані на електрофоретичному спектрі за зростанням рухливості і зменшенням молекулярної маси від *Hel 1* до *Hel 6* [7].

Першим етапом роботи по встановленню рівня гібридності насіння соняшнику є складання так званого еталону для кожної самозапильної лінії, який відображає генетичну конфігурацію самозапильної лінії по генах, які контролюють синтез геліантинів [5, 8]. При цьому вихідні лінії гібриду повинні відповідати генетичному поняттю «лінія», яка повинна бути представлена одним генотипом за всіма локусами. Серед більшості самозапильних ліній соняшнику – батьківських форм гібридів F<sub>1</sub> – існує відмінність по алелях між материнською та батьківською формою гібриду.

Приклади еталонних електрофореграм запасних білків соняшнику наведені на рис. 1-3.

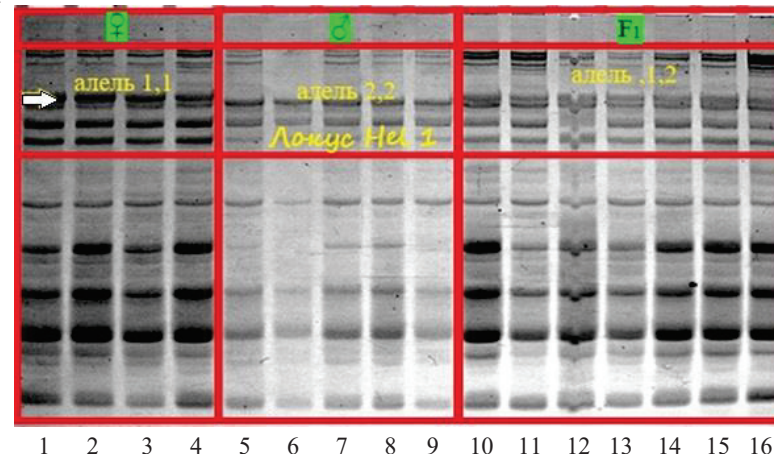


Рис.1. Еталонні електрофореграми з поліморфізмом гену *Hel 1* (1-4 – насінини материнської форми (♀); 5-9 – насінини батьківської форми (♂); 10-16 – насінини гібриду F<sub>1</sub>).

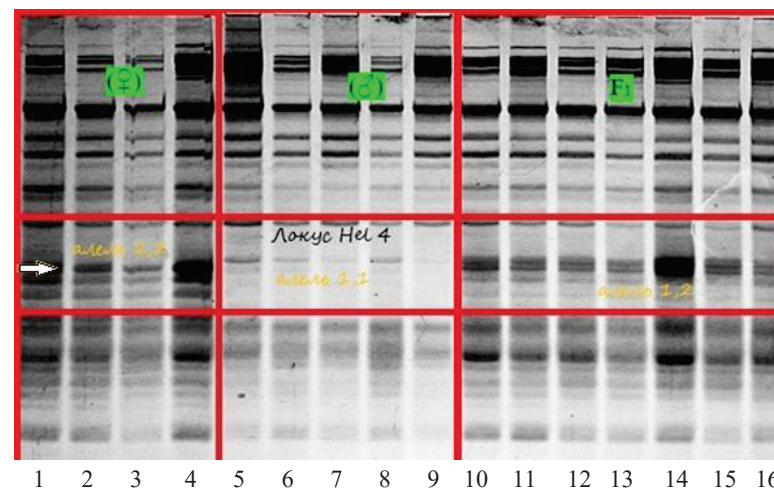


Рис. 2. Еталонні електрофореграми з поліморфізмом гену *Hel 4* (1-4 – насінини материнської форми (♀); 5-9 – насінини батьківської форми (♂); 10-16 – насінини гібриду F<sub>1</sub>).

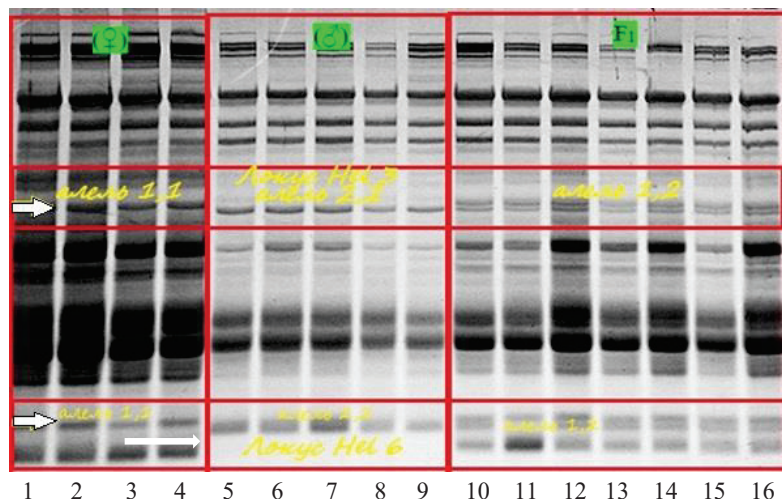


Рис. 3. Еталонні електрофореграми з поліморфізмом генів *Hel 3*, *Hel 6* (1-4 – насінини материнської форми (♀); 5-9 – насінини батьківської форми (♂); 10-16 – насінини гібриду F<sub>1</sub>).

Знаючи еталонні електрофоретичні спектри вихідних батьківських ліній, можна записати генетичну формулу гібриду за поліморфними локусами з поєднанням алелей вихідних ліній. Наприклад, формула материнської лінії за найбільш поліморфними локусами *Hel 1*, *Hel 4*, *Hel 6* : 1,1x1,1x1,1, а батьківської: 2,2x2,2x2,2; тоді генотип гібриду F<sub>1</sub> буде одночасно поєднувати алелі обох батьківських ліній і формула гібриду буде наступною: 1,2x1,2x1,2. В таблиці 5 наведено приклад запису результатів випробувань зразка насіння гібриду соняшнику, а також приклад електрофореграми дослідження (рис. 4).

Таблиця 5

Приклад запису результатів випробувань насіння гібриду соняшнику за електрофорезом геліантинів

№ з/п	Назва зразка	Генетична формула за поліморфними локусами			Кількість генотипів, %
		<i>Hel 1</i>	<i>Hel 4</i>	<i>Hel 6</i>	
1	Еталон гібриду	1,2	1,2	1,2	100
		1,2	1,2	1,2	0
2	Досліджуваний гібрид	1,1	2,2	1,1	52
		1,2	2,2	1,1	44
		1,1	1,1	1,1	2
		1,1	1,2	1,1	2

За результатами випробування можна зробити висновок, що досліджуваний зразок за кількістю і рухомістю електрофоретичних компонентів геліантинів не співпадає з еталонним зразком, наданим для порівняння.

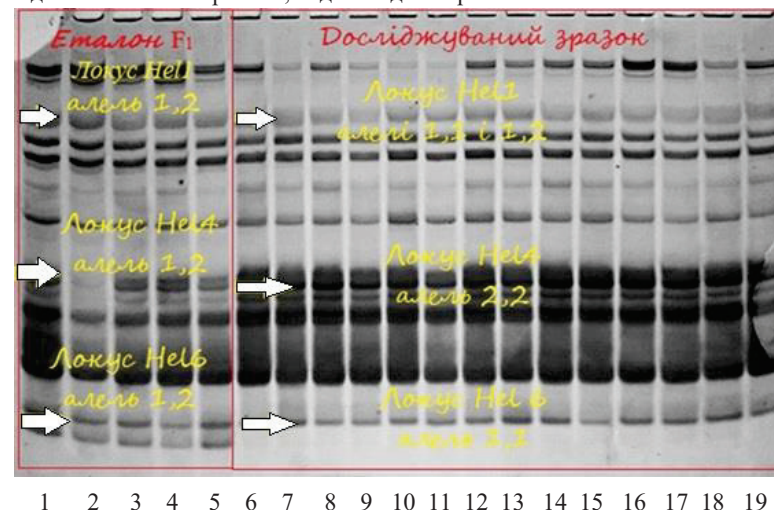


Рис. 4. Приклад еталонної електрофореграми насіння F<sub>1</sub> (1-5) і насіння досліджуваного зразку (6-19) соняшнику (фальсифікат).

Розглянемо інший приклад визначення якості гібридного насіння соняшнику за результатами електрофорезу геліантинів (рис. 5, 6, табл. 6).

Таблиця 6

Результати проведення ідентифікації досліджуваного зразка соняшнику відповідно еталону

№	Назва зразка	Генетична формула за поліморфними локусами			Кількість генотипів, %	
		<i>Hel 1</i>	<i>Hel 4</i>	<i>Hel 6</i>	Еталон гібриду F <sub>1</sub>	Досліджуваний зразок
1	Генотип 1	1,2	1,2	1,2	100	0
2	Генотип 2	2,2	2,2	1,1	-	55
3	Генотип 3	1,2	2,2	1,2	-	38
4	Генотип 4	1,1	2,2	1,1	-	3
5	Генотип 5	1,1	2,2	1,2	-	2
6	Генотип 6	1,2	2,2	1,1	-	2

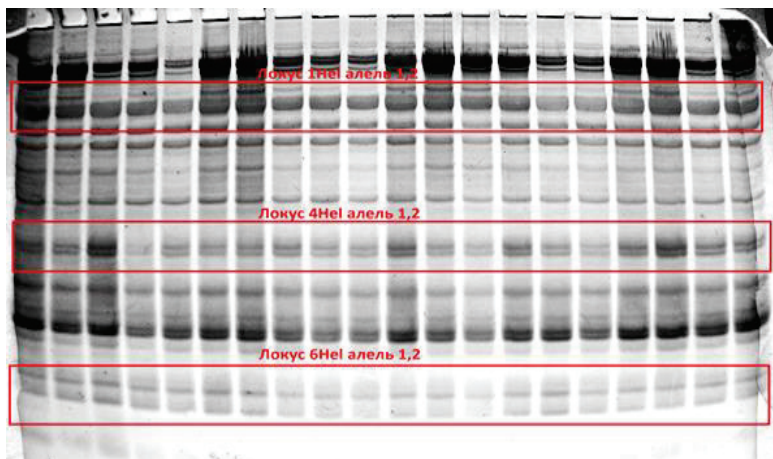


Рис. 5. Еталонна електрофореграма геліантину насіння гібриду соняшнику.

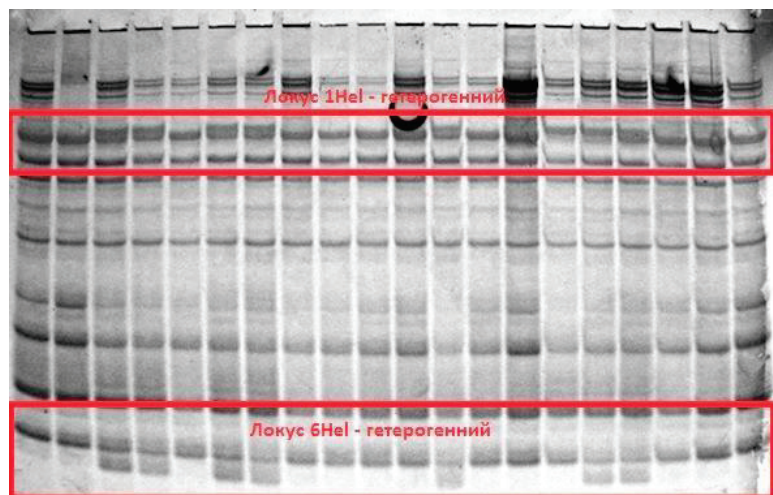


Рис. 6. Електрофореграма геліантинів насіння досліджуваного зразку соняшнику.

За результатами аналізування, можна зробити висновок, що досліджуваний зразок за кількістю і рухомістю електрофоретичних компонентів геліантинів не відповідає еталонному зразку за геліантинкодуючими локусами *Hel 1* та *Hel 6*. Насіння соняшнику, що було надане для дослідження, за локусами геліантинів

неоднорідне і представлено п'ятьма генотипами, найбільший відсоток складають генотипи 2 та 3.

#### 4. ПРИКЛАДИ ВИЗНАЧЕННЯ ТИПОВОСТІ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДНОСТІ НАСІННЯ F<sub>1</sub> КУКУРУДЗИ ЗА ЕЛЕКТРОФЕРЕГРАМАМИ ЗЕЇНІВ

У порівнянні з геліантинами соняшнику, запасні білки кукурудзи зеїни мають деякі переваги: велика концентрація зеїну в зернівці (більше 60 % білка ендосперму), а також легкість та простота екстрагування (водний розчин етилового спирту). Поліморфізм зеїну був виявлений при аналізі проламінів інбредних ліній кукурудзи за допомогою різних методів фракціонування білків. Багаторічні генетичні дослідження виявили три основних зеїнкодуючих локуси, що являють собою мультигенні мультиалельні локуси, за якими було ідентифіковано 33 алелі. Визначено, що зеїнкодуючі гени розташовані на хромосомах 4 та 7 у кукурудзи [9].

Представлена методика дозволяє виявити високий рівень поліморфізму зеїнів, що дозволяє проводити визначення генетичної однорідності ліній, визначення рівня гібридності гібридів кукурудзи.

На рис. 7-10 представлені приклади електрофореграм зеїнів насіння простих гібридів F<sub>1</sub> кукурудзи.

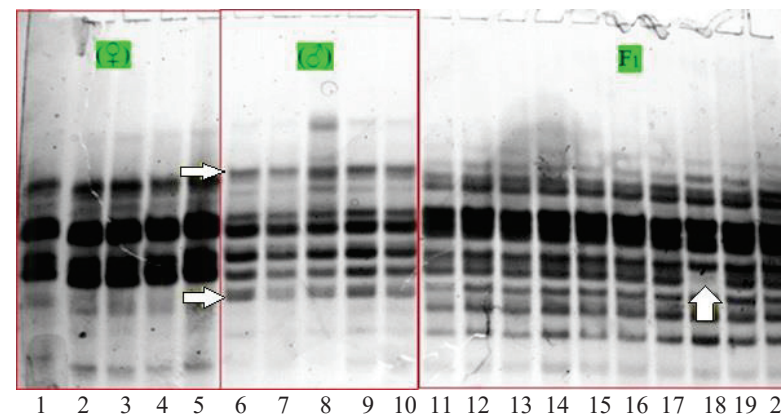


Рис. 7. Електрофореграми зеїнів: 1-5 – насінини материнської форми (♀); 6-10 – насінини батьківської форми (♂); 11-20 – насінини гібриду F<sub>1</sub>, 18 – нетиповий генотип.

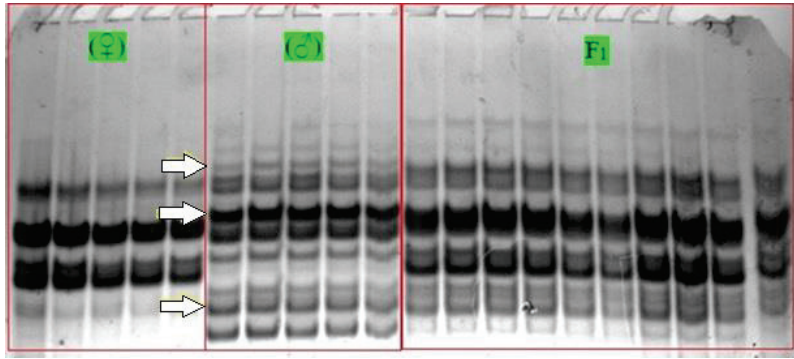


Рис. 8. Електрофореграми зеїнів: 1-5 – насінини материнської форми (♀); 6-10 – насінини батьківської форми (♂); 11-20 – типові насінини гібриду F<sub>1</sub>.

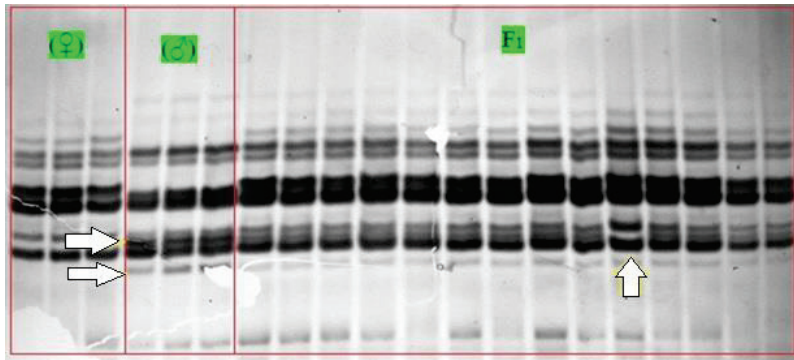


Рис. 9. Електрофореграми зеїнів: 1-3 – насінини материнської форми (♀); 4-6 – насінини батьківської форми (♂); 7-20 – насінини гібриду F<sub>1</sub>, 16 – насінина від самозапилення материнської лінії.

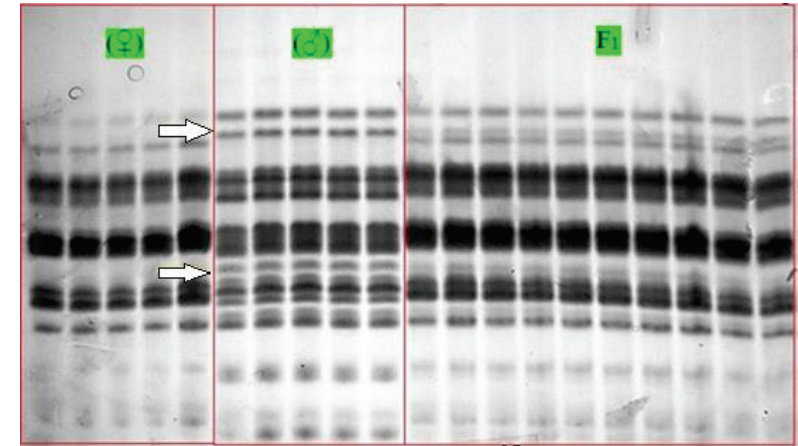


Рис. 10. Електрофореграми зеїнів: 1-5 – насінини материнської форми (♀); 6-10 – насінини батьківської форми (♂); 11-20 – типові насінини гібриду F<sub>1</sub>.

Описаний метод визначення рівня гібридності простих гібридів може бути використаний і для контролю якості трилінійних гібридів. Проте, на практиці часто електрофоретичні спектри самозапиленої батьківської лінії співпадають з компонентами простого гібриду (материнська форма трилінійного), що значно ускладнює визначення якості потрійних гібридів. У таких випадках для визначення рівня гібридності необхідною умовою є наявність додаткового компоненту зеїну батьківської форми у порівнянні хоча б із однією самозапиленою лінією простого материнського гібриду (рис. 11). При самозапиленні рослин простого гібриду (материнська форма трилінійного гібриду) згідно з другим законом Менделя спостерігається розщеплення у співвідношенні 1:2:1, по окремим зонам спектра можна побачити гомозиготи ідентичні самозапилений лінії батьківських форм простого гібриду, яка відрізняється від батьківської форми трилінійного відсутністю компонента в даній зоні. Підрахувавши кількість таких гомозигот і помноживши на 4 (25 % від усіх зерен F<sub>2</sub>), можна визначити число усіх зерен другого покоління простого материнського гібриду, які не є зернами F<sub>1</sub> трилінійного гібриду.

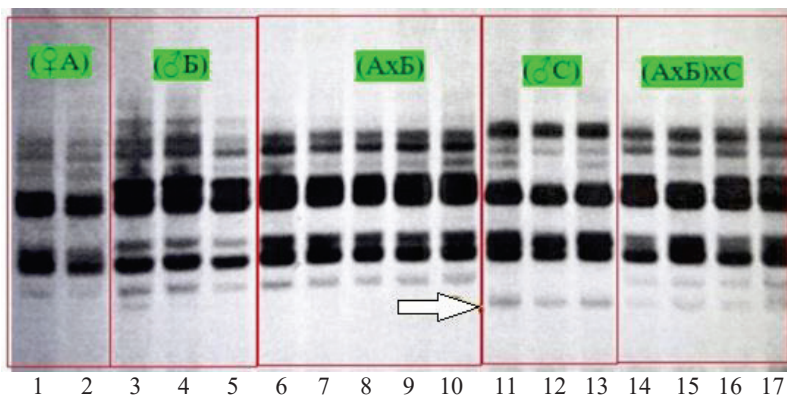


Рис. 11. Електрофореграми зеїнів: 1-2 – насінини лінії кукурудзи А (материнська форма гібриду F<sub>1</sub>); 3-5 – насінини лінії кукурудзи В (батьківська форма гібриду F<sub>1</sub>); 6-10 – насінини гібриду АхВ (материнська форма трилінійного гібриду), 11-13 – насінини лінії кукурудзи С (батьківська форма трилінійного гібриду), 14-17 – насінини трилінійного гібриду (АхВ)хС.

### 5. ВИКОРИСТАННЯ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ ПШЕНИЦІ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ЧИСТОТИ (ОДНОРІДНОСТІ) СОРТІВ

За міжнародними вимогами UPOV та ISTA сорт самозапильованої культури має бути генетично гомогенним (однорідним), тобто повинен складатися з генетично ідентичних рослин за морфологічними, біохімічними та технологічними ознаками. У країнах Євросоюзу, США, Канаді, Австралії та ін. ця вимога є обов'язковою. Якщо сорт пшениці не відповідає вимогам щодо його генетичної однорідності, то він не має шансів бути комерціалізованим.

Як уже відзначалось раніше, генетична однорідність сорту надзвичайно важлива для ідентифікації сорту, захисту авторських прав на сорт, систематизації генетичних колекцій. З генетичною однорідністю сорту пов'язана його технологічність, або здатність задовольняти вимогам певних технологій виробництва продуктів переробки зерна високої і стабільної якості [10].

В Україні при реєстрації сортів самозапильованих культур тест на відповідність критеріям ВОС (відмінність, однорідність, стабільність) включає лише візуальний контроль морфологічних ознак рослин. Жодна біохімічна ознака пшениці, включно з алейним складом клейковинних білків зерна, в системі державного сортопробування не контролюється. Звісно ж такий контроль відсутній і на завершальних етапах селекції сортів та первинних ланках у системі насінництва пшениці [11]. Натомість, електрофоретичний аналіз клейковинних

білків, які визначають фізичні властивості клейковини та хлібопекарські якості борошна, дозволив би контролювати отримання генетично однорідних за алейним станом гліадин- та глютенінкодуєчих локусів технологічно стабільних сортів.

Дослідження генетичної чистоти (однорідності) сорту пшениці розпочинається із визначення еталонної електрофореграми сорту, що був наданий оригіном, і визначення алейного складу клейковинних білків. З середньої проби досліджуваної партії насіння відбирають 100 зерен і проводять електрофоретичний аналіз гліадинів та глютенінів кожного із них. У випадку якщо електрофоретичні спектри гліадинів та глютенінів по всіх проаналізованих локусах відрізняються від електрофореграм еталону: партія насіння не відповідає заявленому сорту. Якщо ж серед отриманих електрофоретичних спектрів гліадинів та глютенінів зерен досліджуваної партії зустрічаються електрофореграми, ідентичні еталонним, а також відмінні від них, то розраховується відсоток нетипових для сорту зерен.

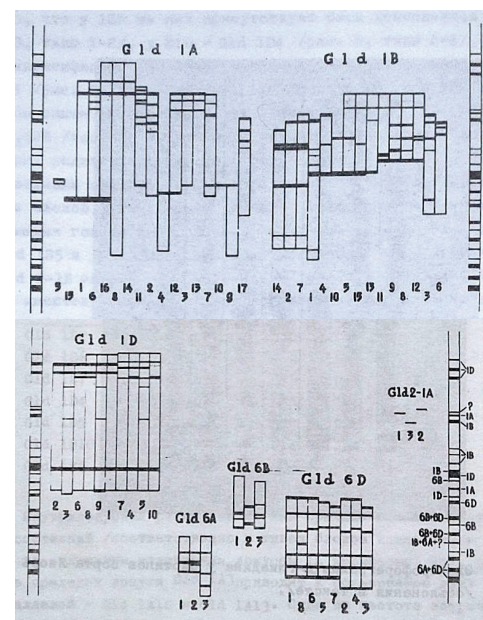


Рис. 12. Каталог алелів гліадинкодуєчих локусів 1А, 1В, 1D, 6А, 6В і 6D хромосом [12]. Зліва і справа – схеми електрофореграм гліадинів сорту Безоста 1.

Ідентифікацію алелів гліадинкодуючих локусів *Gli 1A*, *Gli 1B*, *Gli 1D*, *Gli 6A*, *Gli 6B*, *Gli 6D*, *Gli 2-1A* здійснюють за розробленим в СГІ каталогом (рис. 12).

Результати електрофоретичного аналізу клейковинних білків гліадинів та глютенінів у низки комерційних сортів пшениці селекції СГІ-НЦНС представлені в таблиці 7, де алелі вказані у відповідності до вище наведеного каталогу. Серед сортів є однолінійні (усі рослини сорту мають однаковий генотип за гліадин- та глютенінкодуючими локусами) та популятивні (складаються з сукупностей рослин з різними генотипами за гліадин- та глютенінкодуючими локусами).

Таблиця 7

Генетичні формули сортів озимої пшениці СГІ-НЦНС за алелями гліадин- та глютенінкодуючих локусів

№	Назва сорту	Генотипи	Гліадини							Глютеніни		
			1A	1B	1D	6A	6B	6D	2-1A	1A	1B	1D
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Українка одеська	1	4	1	7	4	2	3	3	2	2	1
2	Одеська 267	1	4	1	5	3	2	4	1	1	5	1
3	Куяльник	1	10	1	5	4	3	1	3	1	5	1
4	Панна	1	10	15	5	1	4	1	3	2	5	1
5	Зустріч	1	3	1	10	4	1	3	3	1	2	1
6	Супутниця	1	4	1	10	3	2	4	1	1	1	1
7	Легідна	1	4	1	4	4	2	2	3	1	2	1
8	Дальницька	1	4	1	2	3	2	4	3	1	2	1
9	Пошана	1	4	1	4	4	2	3	3	1	2	1
10	Альбатрос одеський	1	4	1	4	4	2	2	3	2	2	1
		2	4	1	4	4	2	3	3	2	2	1
11	Красуня одеська	1	4	1	5	3	2	2	3	1	2	1
		2	4	1	5	3	3	2	3	1	2	1
12	Лузанівка одеська	1	4	2	7	3	2	4	1	2	1	1
		2	5	2	7	3	2	4	1	2	1	1
13	Сирена одеська	1	2	1	1	4	2	3	3	2	2	1
		2	4	1	1	4	2	3	3	2	2	1
14	Пріма одеська	1	5	4	1	4	2	4	3	1	2	1
		2	5	2	1	4	2	4	3	1	2	1
15	Ніконія	1	4	1	4	1	2	1	3	2	2	1
		2	4	1	4	4	2	1	3	2	2	1
16	Одеська 265	1	4	1	10	3	2	4	1	1	1	1
		2	4	1	10	3	2	4	1	1	2	1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
17	Зірниця	1	4	4	4	4	2	4	1	1	1	2
		2	4	4	4	4	2	4	3	1	1	2
18	Леся одеська	1	4	1	7	3	2	1	3	2	2	1
		2	4	1	7	4	2	1	3	2	2	1
19	Вікторія одеська	1	4	1	5	3	2	2	3	1	1	1
		2	4	1	5	3	2	2	3	1	2	1
		3	4	1	5	4	2	2	3	1	1	1
		4	4	1	5	4	2	2	3	1	2	1
20	Застава одеська	1	4	4	4	3	2	1	1	1	2	1
		2	4	4	4	3	2	1	1	1	3	1
		3	4	4	4	3	2	4	1	1	2	1
		4	4	4	4	3	2	4	1	1	3	1
21	Лада одеська	1	2	1	4	3	2	1	1	2	1	1
		2	2	1	4	3	2	4	1	2	1	1
		3	4	1	4	3	2	1	1	2	1	1
		4	4	1	4	3	2	4	1	2	1	1
22	Досвід	1	4	1	4	3	2	4	3	1	2	1
		2	4	1	4	3	2	4	3	1	3	1
		3	4	4	4	3	2	4	3	1	2	1
		4	4	4	4	3	2	4	3	1	3	1
23	Повага	1	4	1	5	4	2	3	1	1	1	1
		2	4	1	5	4	2	3	1	1	1	1
		3	2	1	5	4	2	3	1	2	1	1
		4	2	1	5	4	2	3	1	2	1	1
24	Фантазія одеська	1	4	1	5	4	2	2	3	1	2	1
		2	4	1	5	4	2	3	3	1	2	1
		3	4	1	5	4	3	2	3	1	2	1
		4	4	1	5	4	3	3	3	1	2	1
25	Писанка	1	4	1	5	3	2	2	3	1	1	1
		2	4	1	5	3	2	2	3	1	2	1
		3	4	1	5	4	2	2	3	1	1	1
		4	4	1	5	4	2	2	3	1	2	1

Приклади електрофореграм гліадинів сортів пшениці представлені на рис. 13-15.

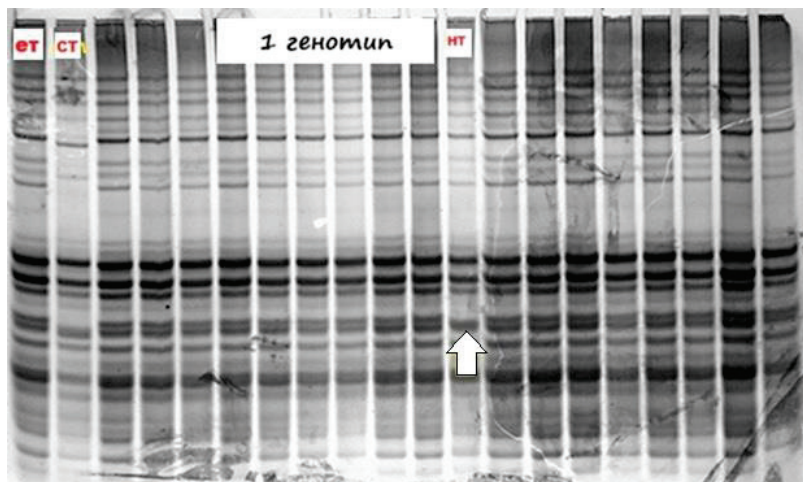


Рис. 13. Електрофореграма гліадинів однолінійного сорту (один генотип): 1 – еталон, 2 – зернівка сорту-стандарту (Альбатрос одеський), 3-20 – окремі зернівки сорту 1; 12 – нетипова для дослідженого сорту зернівка («засмічення»).

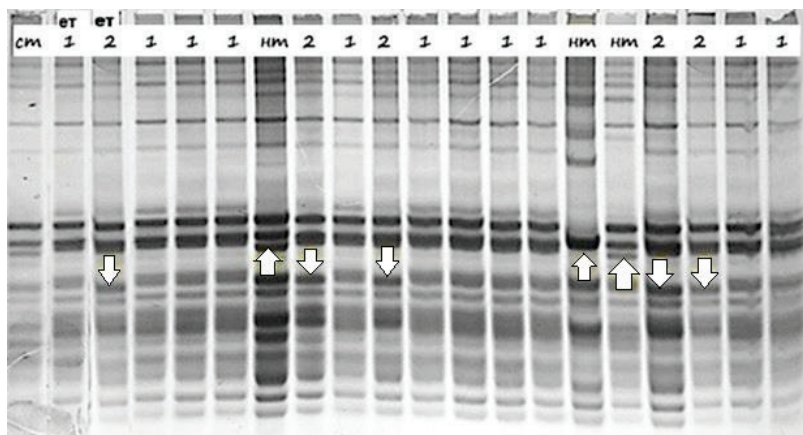


Рис. 14. Електрофореграма гліадинів сорту, який представлений двома генотипами: 1 – зернівка сорту-стандарту (Альбатрос одеський), 2 – еталон генотипу «1», 3 – еталон генотипу «2»; 3-20 – окремі зернівки, 7, 15, 16 – нетипові для дослідженого сорту зернівки («засмічення»).

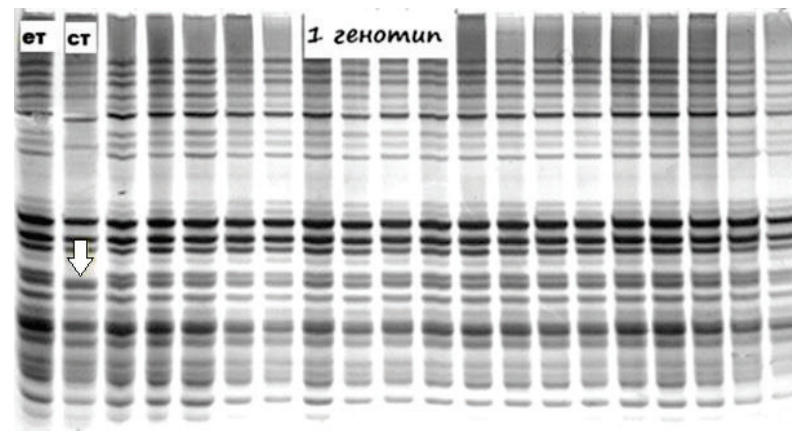


Рис. 15. Електрофореграма гліадинів однолінійного сорту (один генотип): 1- еталон; 2 – зернівка сорту-стандарту (Альбатрос одеський); 3-20 – окремі зернівки дослідженого сорту.

Використання електрофоретичного аналізу в первинних ланках насінництва сприятиме досягненню високої генетичної чистоти сортів пшениці. Індивідуальні добори елітного колосся (а не рослин) повинні контролюватися за складом алелів *Gli-* та *Glu-* локусів, для чого з кожного дібраного колоса, призначеного для посіву, достатньо залишити чотири насінини для електрофоретичного аналізу. Перспективна селекційна лінія при передачі в систему Державного сортопробовування, повинна бути перевіреною на генетичну однорідність за алельним складом *Gli-* та *Glu-* локусів.

Такий підхід гарантуватиме повну відповідність комерційного сорту пшениці міжнародним вимогам до генетичної однорідності сортів самозапилених культур та високу технологічність за показниками хлібопекарської якості.

## 6. ВИКОРИСТАННЯ ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ ГОРДЕЇНІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ЧИСТОТИ (ОДНОРІДНОСТІ) СОРТІВ ЯЧМЕНЮ

Для ефективної роботи по визначенню сортової чистоти та ідентифікації насіння за допомогою електрофезу запасних білків електрофоретичні спектри білків більшості сортів повинні відрізнятися, що забезпечується наявністю декількох поліалельних генів чи локусів, які контролюють синтез цих білків. Крім того, електрофореграми не повинні залежати від умов та місця вирощування

сортів, а методика має бути швидкою та продуктивною. Всім цим вимогам найбільш повно у ячменя відповідають спирторозчинні білки ендосперму – гордеїни, які відносяться до класу проламінів. Вони складають близько 50 % сумарного білку зернівки, досить поліморфні і характеризуються сортоспецифічністю.

Визначення успадкування гордеїнів в гібридних комбінаціях дозволило встановити, що в основному електрофоретичні компоненти гордеїну контролюються сімома зчеплено успадковуваними локусами: *Hrd A*, *Hrd B*, *Hrd C*, *Hrd D*, *Hrd E*, *Hrd F*, *Hrd G*, які розміщені на короткому плечі хромосоми 5 (1H) ячменю. Три локуси: *Hrd A*, *Hrd B* і *Hrd F* є дуже поліморфними [13].

Білки гордеїнокодуючих локусів *Hrd A*, *Hrd B*, *Hrd C* на електрофоретичному спектрі розділені просторово, що дає змогу створювати каталоги аельних варіантів локусів компонентів (рис. 16) [14].

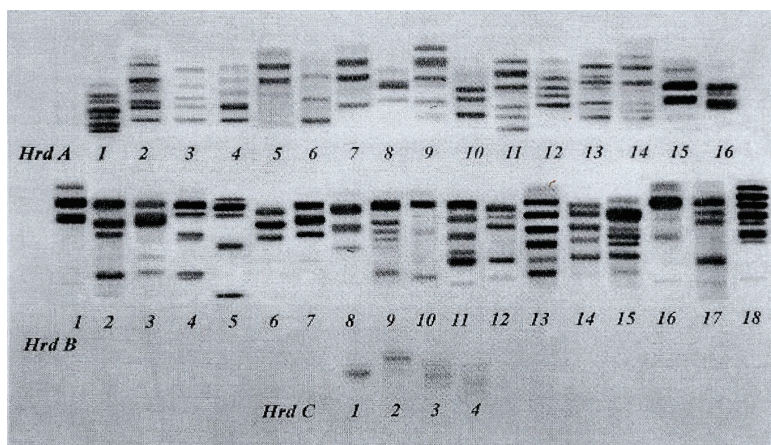


Рис. 16. Каталог аелів гордеїнокодуючих локусів *Hrd A*, *Hrd B*, *Hrd C*

Першим етапом роботи є визначення еталонної електрофореграми сорту, наданого оригіном і визначення його генотипного складу. При аналізованні сортових якостей партій насіння від середньої проби відбирають 100 зерен і проводять електрофоретичний аналіз горденів кожної із них. У випадку якщо електрофоретичні спектри горденів відрізняються від електрофореграм еталону, партія насіння не відповідає заявленому сорту. Якщо ж серед отриманих електрофоретичних спектрів горденів у зерен досліджуваної партії зустрічаються електрофореграми, ідентичні еталонним, а також відмінні від еталонних, то розраховується відсоток нетипових для сорту зерен.

Більшість сортів ячменю селекції СГІ-НЦНС є однолінійними за гордеїнокодуючими локусами, оскільки вони характеризуються електрофоретичними спектрами гордеїнів одного типу. Частина сортів мають два і більше варіанта електрофоретичних спектрів гордеїнів, що відрізняються за компонентами, тобто ці сорти не є однолінійними за гордеїнокодуючими локусами [15]. На рис. 17 (А, Б, В) наведені приклади електрофореграм гордеїнів однолінійних сортів ячменю зі 100 % рівнем сортової чистоти; на рис. 18 - електрофореграма гордеїнів сорту ячменю, який складається з двох генотипів, зі 100 % рівнем сортової чистоти. На рис. 19 наведено приклад електрофореграми сорту ячменю, для якого виявлено засмічення нетиповими зернівками.

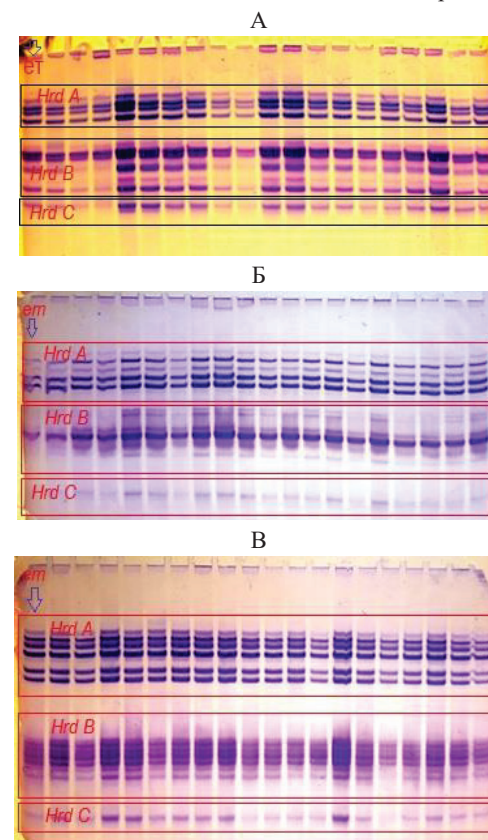


Рис. 17 А, Б, В. Електрофореграми гордеїнів однолінійних сортів ячменю (сортова чистота дорівнює 100 %); «ет» - еталонний зразок досліджуваного сорту.

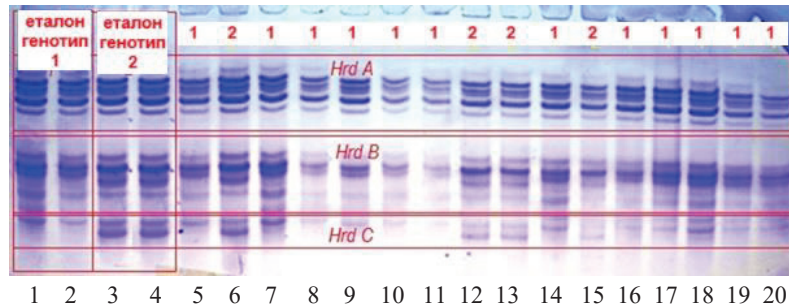


Рис. 18. Електрофореграма гордеїнів сорту ячменю, який складається з двох генотипів: 1-2 – еталон генотипу «1»; 3-4 – еталон генотипу «2»; 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20 – зернівки з генотипом «1»; 6, 12, 13, 15 – зернівки з генотипом «2». Сортова чистота досліджуваного сорту 100 %.

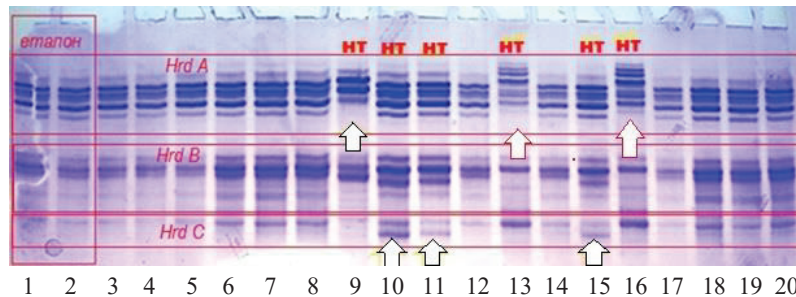


Рис. 19. Електрофореграма гордеїнів засміченого сорту ячменю: 1-2 – зернівки еталонного зразка досліджуваного сорту; 9, 10, 11, 13, 15, 16 – нетипові для досліджуваного сорту зернівки. Сортова чистота досліджуваного сорту 65 %.

Сорти самозапильних культур, наприклад пшениці та ячменю, створюються, як правило, шляхом індивідуального добору із гібридних популяцій в  $F_2 - F_6$  з наступним об'єднанням кращих сімей. В ранніх поколіннях спостерігається значна кількість гетерозиготних рослин по багатьох генах, а результати добору за морфологічними ознаками не завжди дозволяють досягти відповідної чистоти сорту. До того ж, за неконтрольованими ознаками (в тому числі за запасними білками) багато сортів представляють собою популяції. В процесі первинного насінництва таких сортів може відбуватися зміна генетичної структури, що в свою чергу призводить до зміни господарських характеристик сорту. Використання результатів електрофорезу запасних білків дає змогу швидко та ефективно визначати сортову приналежність і сортову чистоту як насінневих партій, так і товарних зразків.

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Либенко М.О., Ганжело М.Г., Бабич В.І., Костюк С.В. Вплив рівня гібридності на прояв господарсько-цінних ознак соняшнику. Зб. наукових праць СГІ. 2002. Вип. 2(42). С.64-69.
2. Попереля Ф.О., Рибалка О.І., Червоніс М.В., Топораш І.Г., Благодарова О.М. Національний стандарт України на визначення генетичної чистоти сортів пшениці, ячменю, типовості самозапилених ліній та рівня гібридності насіння першого покоління гібридів кукурудзи та соняшнику. Зерно і хліб. 2006. № 1. С. 42-45.
3. International Seed Testing Association: International Rules for Seed Testing, edition 2015. ISTA, Basserdorf.
4. UPOV, (2019a): TGP/10/2 . Examining uniformity . International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Geneva .
5. Попереля Ф.А., Нецветаев В.П. Генетический контроль гелиантина семян у подсолнечника (*Helianthus annuus*). Цитология и генетика. 1994. Т. 28. № 4. С.59-63.
6. ДСТУ 4138-2002 Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН. 2002.
7. Аксенов И.В. Идентификация белковых спектров в гибридных комбинациях подсолнечника. Научно-технический бюллетень Института олійних культур УААН. 2009. № 14. С. 3-7.
8. Попереля Ф.О. Генетична інтерпретація електрофореграм геліантину насіння  $F_1$  соняшника. Цитология и генетика. 2000. № 2. С. 84-90.
9. Zayakina G. V. Inheritance of zeins: The catalogue of zein alleles of three multigenic loci and its potential for maize breeding. Plant Breeding. 2000. Vol. 119. P. 51-57.
10. TGP/9/1 EXAMINING DISTINCTNESS / Adopted by the Council at its twenty-fifth extraordinary session on April 11, 2008. URL: [http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_9\\_1.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_9_1.pdf): (дата звернення 11.04.2013).
11. Рибалка О.І., Червоніс М.В., Литвиненко М.А. Генетична гетерогенність сортів пшениці одеської селекції за складом Gli/Glu – локусів, що кодують біосинтез білків клейковини. Зерно і хліб. 2008. С. 25-34.
12. Попереля Ф.О. Три основні генетичні системи якості зерна озимої м'якої пшениці. Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України. Зб. наукових праць СГІ. 1996. С. 117-132.
13. Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Созінов О.О. Поліморфізм культурного ячменю (*Hordeum vulgare* L.) за гордеїнами. Генетика. 1985. Т 21. №4. С.629-639.
14. Мажаренко М.М. Використання гордеїнів як маркерів ступеня зимостійкості озимого ячменю: автореф. дис... канд. біол. наук. Одеса: СГІ НАЦ-НАІС, 2005. 21 с.
15. Червоніс М.В., Благодарова О.М., Сурженко І.О. Контроль якості насіння методом електрофорезу запасних білків. Насінництво. 2010. № 9. С. 13-19.

*Наукове-виробниче видання*

**ЧЕРВОНІС Михайло Володимирович  
РИБАЛКА Олександр Ілліч  
БЛАГОДАРОВА Олена Михайлівна  
СОЛОДЕНКО Анжелла Євгенівна**

**КОНТРОЛЬ ГЕНЕТИЧНОЇ ЧИСТОТИ  
(ОДНОРІДНОСТІ) СОРТІВ ПШЕНИЦІ І ЯЧМЕНЮ,  
ТИПОВОСТІ САМОЗАПИЛЕНИХ ЛІНІЙ  
ТА РІВНЯ ГІБРИДНОСТІ ГІБРИДІВ  $F_1$   
КУКУРУДЗИ І СОНЯШНИКУ**

Методичні рекомендації

Відповідальний за випуск  
**СОКОЛОВ Вячеслав Михайлович**

Надруковано з готового оригінал-макета  
в авторській редакції

**К64** **Контроль** генетичної чистоти (однорідності) сортів пшениці і ячменю, типовості самозаплених ліній та рівня гібридності гібридів  $F_1$  кукурудзи і соняшнику : методичні рекомендації / авт.: М. В. Червоніс, О. І. Рибалка, О. М. Благодарова [та ін.] ; відп. за вип. В. М. Соколов ; СГІ–НЦНС. — Одеса : Астропринт, 2025. — 36 с.

ISBN 978–617–8569–26–6

В запропонованих методичних рекомендаціях викладені основні принципи та наведені приклади використання електрофорезу запасних білків насіння при визначенні генетичної чистоти сортів самозаплених культур пшениці та ячменю, типовості самозаплених ліній та рівня гібридності насіння простих і трилінійних гібридів соняшнику та кукурудзи.

Методичні рекомендації розраховані на науковців установ Національної академії аграрних наук, керівників та спеціалістів насінневих компаній та інших сільськогосподарських підприємств різних форм власності.

УДК 633.854.78:633.1

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 2,09.  
Тираж 300 прим. Зам. № 403 (105).

Видавництво і друкарня «Астропринт»  
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21  
Тел.: (0482) 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855  
**e-mail: astro\_print@ukr.net; www.astroprint.ua**

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1373 від 28.05.2003 р.