



МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ
ТА ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ



УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ЕКСПЕРТИЗИ СОРТІВ РОСЛИН

УІЕСР

Український інститут
експертизи сортів рослин

Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських культур за допомогою SSR маркерів

Методичні рекомендації

Вінниця
ТОВ «ТВОРИ»
2019 р.

МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ
Український інститут експертизи сортів рослин

**Визначення
молекулярно-генетичного поліморфізму
сільськогосподарських культур
за допомогою SSR маркерів**

Методичні рекомендації

Вінниця
«ТВОРИ»
2019 р.

Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських культур за допомогою SSR маркерів

Рецензенти: Волкова Н. Е. – доктор біологічних наук, заступник начальника відділу молекулярної генетики та фітосанітарної експертизи, ТОВ «Котекна Україна Лімітед»;

Сорочинський Б. В. – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії проблем біобезпеки, ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України».

В 41 Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських культур за допомогою SSR маркерів: метод. реком. / Міністерство аграрної політики та продовольства України; Український інститут експертизи сортів рослин. – Вінниця: ТОВ «ТВОРИ», 2019. – 20 с.

Методичні рекомендації розроблено в Українському інституті експертизи сортів рослин.

В методичних рекомендаціях представлено результати досліджень проведених в Українському інституті експертизи сортів рослин. Авторами запропоновано застосування SSR маркерів для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів картоплі, ріпаку та ліній цукрових буряків з метою їх диференціації та управління колекціями сортів.

Рекомендації призначені для селекціонерів, спеціалістів наукових установ, викладачів університетів та аспірантів, які вивчають теоретичні та методологічні основи сучасної селекції, експертизи сортів рослин та проводять роботу по застосуванню SSR маркерів для генотипування сортів та ліній.

Зміст

Список умовних позначень та скорочень	4
Вступ	5
1. Екстракція ДНК з рослинного матеріалу	7
2. Визначення концентрації та чистоти ДНК	9
3. Проведення ампліфікації ДНК сортів картоплі, ріпаку та ліній цукрових буряків	10
4. Електрофорез продуктів ампліфікації	13
5. Визначення генетичних дистанцій на основі поліморфізму ДНК	15
Список використаних літературних джерел	19

Список умовних позначень та скорочень

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфати

Taq-полімераза – термостабільна ДНК-полімераза, виділена з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*

ВОС експертиза – експертиза на відмінність, однорідність, стабільність

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

нм – нанометр

п.н. – пари нуклеотидів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

TBE – тріс-боратний буфер для електрофорезу

TE – буфер для розчинення ДНК

Вступ

Зважаючи на фенотипову мінливість сортів, яка напряду належить від факторів навколишнього середовища та агротехнічних заходів, оцінки сортів за морфологічними ознаками часто буває недостатньо для того, щоб ідентифікувати селекційний матеріал та отримані сорти. Застосування молекулярно-генетичного аналізу дозволяє вивчати генетичну мінливість на рівні ДНК, що значно підвищує точність оцінки генетичного різноманіття та ідентифікації сортів [1; 9; 16]. Використання молекулярних маркерів на основі ДНК забезпечує ефективний підхід щодо вирішення питань ідентифікації та характеристики сортів рослин.

Існує багато видів молекулярних маркерів, які використовуються для ідентифікації та моніторингу генетичної мінливості у різних видів рослин. До них належать прості мікросателітні повтори (SSR – Simple Sequence Repeats), які мають численні переваги: локус-специфічність, кодомінантність, високу чисельність в геномі, велику кількість алелів [10]. Такі властивості створюють можливості для диференціації, ідентифікації та паспортизації сортів, ліній і гібридів та вихідних форм рослин. Оцінка сортів рослин за ДНК маркерами забезпечує комплексний підхід до вивчення сортового різноманіття, визначення відмінності досліджуваних сортів, оцінки ступеня гібридності [2; 19; 27].

Відповідно до рекомендаційних документів Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин (UPOV) передбачено застосування біохімічних та ДНК маркерів як додатковий метод експертизи на ВОС для визначення відмінності та подібності різних генотипів, а також оцінки генетичних дистанцій між ними. Залучення ДНК маркерів в комплексі із вивченням морфологічних характеристик застосовується для вирішення спірних питань щодо типовості гібридів, походження сортів та в кінцевому підсумку дає можливість з високою ефективністю проводити аналізування сортів при проведенні експертизи на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС).

Використання молекулярних маркерів на основі SSR-аналізу забезпечує надійний підхід щодо вирішення питань диференціації та характеристики сортів рослин [7]. Вони дозволяють виявити відмінності між досліджуваними генотипами, що вказує на їх високу роздільну здатність. Технології молекулярних маркерів дозволяють отримувати швидкі та відтворювані результати, що не залежать від умов зовнішнього середовища і можуть бути отримані на різних стадіях розвитку рослини. Дані, отримані за допомогою аналізу ДНК, поряд із описом морфологічних ознак, дозволяють оцінити не тільки відмінності між сортами, але й визначити генетичні дистанції, які слугують додатковими характеристиками для управління колекціями сортів. Дослідження поліморфізму ДНК сортів рослин успішно застосовується закладами експертизи сортів рослин в європейських країнах (Naktuibow, GEVES) для управління референсними колек-

ціями на основі оцінки генетичних дистанцій між сортами, та як результат – скорочення площ польових випробувань. Такий підхід є актуальним і для України у зв'язку із постійним розширенням сортового потенціалу в країні.

У представлених рекомендаціях описано умови та особливості визначення молекулярно-генетичного поліморфізму за SSR маркерами для картоплі, ріпаку та цукрових буряків, наведено метод визначення генетичних дистанцій за допомогою програми STATISTICA.

1. Екстракція ДНК з рослинного матеріалу

Для виділення ДНК з рослинного матеріалу застосовується метод екстракції на основі СТАВ. При певній концентрації солі (NaCl) СТАВ утворює нерозчинний комплекс з нуклеїновими кислотами. Білки, полісахариди та фенольні сполуки, які знаходяться у водному розчині, відділяються від комплексу нуклеїнових кислот із СТАВ осадженням хлороформом [3; 8].

Реактиви для виділення ДНК

ізопропіловий спирт; ізопропанол; 2-пропанол – $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ ($M_m=60,10$);

EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid; етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль дигідрат; $\text{Na}_2\text{EDTA}\times 2\text{H}_2\text{O}$, EDTA ($M_m = 372,24$);

етиловий спирт; етанол – $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ($M_m = 46,07$);

протеїназа-К (20 мг/мл);

Tris (hydroxymethyl) aminomethane; 2-аміно-2-гідрооксиметил-1,3-пропандіол; тріс; TRIZMA – $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ($M_m = 121,10$);

хлорид натрію; NaCl ($M_m = 58,44$);

хлороформ; трихлорметан; метилтрихлорид – CHCl_3 ($M_m = 119,37$);

СТАВ; cetyltrimethylammonium bromide; ЦТАБ – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$ ($M_m = 364,50$).

Приготування розчинів

Розчин 0,5 М EDTA pH 8,0. Зважують 37,22 г EDTA і розчиняють в 150 мл деіонізованої води. pH розчину до 8,0 доводять за допомогою NaOH. Кінцевий об'єм розчину – 200 мл. Зберігають за температури 4°C до 6 місяців.

Лізуючий СТАВ-розчин. Зважують наступні компоненти: СТАВ – 4 г; NaCl – 16,4 г; Tris – 3,15 г; EDTA – 1,5 г. Додають до суміші 100 мл деіонізованої води. pH розчину 8,0 отримують додаючи 1 М NaOH. Фінальний об'єм розчину – 200 мл. Кінцеві концентрації компонентів: 20 мМ EDTA; 100мМ Tris-HCl; 1,4 М NaCl; 2% СТАВ. Зберігають за температури 4°C до 4 місяців.

СТАВ-розчин для преципітації pH 8,0. Зважують наступні компоненти: СТАВ – 1 г; NaCl – 0,5 г. Додають до суміш реактивів 100 мл деіонізованої води. pH розчину регулюють за допомогою 1 М NaOH. Фінальний об'єм – 200 мл. Кінцеві концентрації компонентів: 0,5% СТАВ; 0,04 М NaCl. Зберігають розчин при 4°C до 4 місяців.

Розчин 1,2 М NaCl. Зважують NaCl – 7 г та розчиняють в 80 мл деіонізованої води. Фінальний об'єм – 100 мл. Зберігають при кімнатній температурі до 6 місяців.

Розчин ТЕ. Концентровані розчини компонентів додають у такій кількості: 0,5 М EDTA pH 8,0 – 400 мкл; 1 М Tris-HCl pH 8,0 – 1 мл. До кінцевого об'єму – 200 мл доводять деіонізованою водою.

Кінцеві концентрації *ТЕ* розчину: 1мМ *EDTA* рН 8,0; 10 мМ *Tris-HCl* рН 8,0. Зберігають розчин при 4°C до 6 місяців.

Розчин 70% етилового спирту. В мірний циліндр вносять 70 мл 95% етилового спирту та доводять об'єм до 95 мл деіонізованою водою. Зберігають розчин при 4°C до 6 місяців [8].

Порядок роботи

1. Для виділення ДНК взяти наважку 50-100 мг зразка (подрібнена насінина або рослинний матеріал – проросток, фрагмент листової платини).

2. В ступку або мікроцентрифужну пробірку додати 500 мкл лізуючого **СТАВ-розчину**, перенести рослинний матеріал та гомогенізувати зразок.

3. У разі виділення ДНК з насіння, подрібнену насінину перенести в мікроцентрифужну пробірку та додати 500 мкл **лізуючого СТАВ-розчину**.

4. У суміш зразок-лізуючий **СТАВ-розчин** додати 300 мкл стерильної деіонізованої води, провортексувати 30 с.

5. Додати 1 мкл **Протейнази-К**, перемішати та інкубувати за температури 65°C 45 хв.

6. Центрифугувати за 13000 g протягом 10 хв.

7. Перенести ~300 мкл супернатанту в нову мікроцентрифужну пробірку та додати **хлороформ** у співвідношенні 1:1 до відібраного супернатанту, обережно перемішувати протягом 30 с.

8. Центрифугувати за 13000 g протягом 10 хв.

9. Перенести верхній шар (~250 мкл) в нову мікроцентрифужну пробірку та додати **хлороформ** у співвідношенні 1:1 до відібраного супернатанту, обережно перемішувати протягом 30 с.

10. Центрифугувати за 13000 g протягом 5 хв.

11. Додати 2 об'єми **СТАВ-розчину для преципітації**, обережно перемішати.

12. Інкубувати 60 хв за кімнатної температури.

13. Центрифугувати за 13000g протягом 5 хв.

14. Супернатант видалити, не зачіпаючи осад (преципітат).

15. Розчинити преципітат в 350 мкл **1,2 М NaCl**.

16. Додати 0,6 об'єму (210 мкл) охолодженого **ізопропілового спирту**, обережно перемішати.

17. Центрифугувати за 13000 g протягом 10 хв.

18. Супернатант видалити, не зачіпаючи осад.

19. Додати 500 мкл **70% етилового спирту** і обережно перемішати.

20. Центрифугувати за 13000 g протягом 10 хв.

21. Супернатант видалити, осад підсушити за 60°C протягом 1 год.

22. Сухий осад отриманої ДНК розчинити в 50 мкл **ТЕ-буферу**.

Отриману ДНК одразу використати для проведення ПЛР або зберігати за температури +4°C не більше одного місяця.

2. Визначення концентрації та чистоти ДНК

Молекули нуклеїнових кислот здатні поглинати світло в ультрафіолетовій області спектру, що застосовується для визначення їх концентрації. Кількісний вміст ДНК визначається за довжини хвилі 260 нм в порівнянні із стандартним розчином. Кількість молекул ДНК в розчині корелює з інтенсивністю поглинання світла. Відношення поглинання при довжинах хвиль 260 нм і 280 нм (260/280 нм) показує чистоту ДНК. Для вимірювання концентрації та чистоти нуклеїнових кислот використовують спектрофотометр [5].

Порядок роботи

1. В окремих пробірках приготувати розчин з 3 мкл ДНК кожного зразка та 47 мкл **ТЕ-буферу** (загальний об'єм – 50 мкл).

2. Перед початком вимірювання інтенсивності поглинання розчинів ДНК, провести вимірювання контрольного розчину. Кювету (довжина оптичного шляху – 10 мм) заповнити 50 мкл **ТЕ-буферу** та виставити показники спектрофотометру на нульове значення. Після цього замінити кювету.

3. Провести вимірювання інтенсивності поглинання **розчинів ДНК**. З метою зменшення погрішності, вимірювання слід провести в двохкратній повторності.

Концентрація ДНК у розчині зазвичай виражається в мкг/мл або нг/мкл. Розчин ДНК вважається чистим, якщо відношення значень 260/280 нм наближається до 1,8 [5].

3. Проведення ампліфікації ДНК сортів картоплі, ріпаку та ліній цукрових буряків

З метою оцінки поліморфізму сортів картоплі, ріпаку та ліній цукрових буряків за SSR маркерами проводять ПЛР із подальшим розділенням продуктів ампліфікації в агарозному гелі [7]. Відповідно до аналізу літературних джерел, SSR маркери, які рекомендовано для дослідження, характеризуються високими значеннями індексу поліморфності локуса (PIC) – від 0,5 до 0,9 [10; 11; 15; 17; 18; 20; 23-26; 28].

Характеристика праймерів

Послідовності та інші характеристики праймерів для сортів картоплі наведені в таблиці 4.1, ріпаку – в таблиці 4.2 та ліній цукрових буряків – в таблиці 4.3.

Таблиця 4.1. – Характеристика праймерів для SSR локусів ДНК сортів картоплі

Назва	Послідовність нуклеотидів праймерів 5'...3'	Мотив	Очікуваний розмір ампліконів, п.н.	Літературні джерела
STM 0019	F* – aataggtgtactgactctcatg	(AT) ₇ (GT) ₁₀	99-206	1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/6102906 2. Milbourne, D. et al. (1998)
	R** – ttgaagtaaagtctgatgatgtg	(AT) ₄ (GT) ₅ (GC) ₄ (GT) ₄		
STM 3009	F – tcagctgaacgaccactgttc	(TC) ₁₃	110-140	
	R – gatttcaccaagcatggaagtc			
STM 3012	F – caactcaaacagaaagcgaac	(CT) ₄ (CT) ₈	180-225	Tierno, R., & de Galarreta, J. I. R. (2017)
	R – gagaatggggcacaaaaaca			
STM 5136	F – gggaaaaggaaaagctcaa	(AGA) ₅	240-280	
	R – caacactatcgccatctccttt			

Таблиця 4.2. – Характеристика праймерів для SSR локусів ДНК сортів ріпаку

Назва	Послідовність нуклеотидів праймерів 5'...3'	Мотив	Очікуваний розмір ампліконів, п.н.	Літературні джерела
Ra3-H09	F* – gtggaacgacgggtccattc	(TGG) ₃	119-129	1. Li, L. et al. (2011) 2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/6104251
	R** – acccagcgaagactcatcc			
Na12-A02	F – agccttggtgctttcaacg	(CT) ₁₆	161-202	1. Li, L. et al. (2011) 2. Tommasini, L. et al. (2003)
	R – agtgaatcgatgatctcgcc			
FITO-063	F – gttcaggtcccagattcctaa	(CCG) ₁₅	267-700	1. Li, L. et al. (2011) 2. Iniguez-Luy, F. L. et al. (2008)
	R – ttctctctctctctctcttc			
Na10-B07	F – gccttagattagatggtcgcc	(CT) ₂₉	174-213	1. Li, L. et al. (2011) 2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/6104148
	R – actcagctccgatttgcc			

Таблиця 4.3. – Характеристика праймерів для SSR локусів ДНК ліній цукрових буряків

Назва	Нуклеотидна послідовність праймерів 5' 3'	Мотив	Очікуваний розмір ампліконів, п.н.	Літературні джерела
SB04	F* – accgatcacaattccacat	(GGA) ₄ (GTT) ₈	172–187	Richards, C. M. et al. (2004)
	R** – gttttgttttgggcgaaatg			
SB07	F – tgtggatgcgctttcttttc	(TC) ₁₀	246–276	
	R – actccacccatccacatcat			

Назва	Нуклеотидна послідовність праймерів 5' 3'	Мотив	Очікуваний розмір ампліконів, п.н.	Літературні джерела
SB15	F – caccagcctatctctcgac	(CT) ₈	135–165	Richards, C. M. et al. (2004)
	R – gtgggtgggcagtttagga			
GZM086	F – acttctaattggagtaagaatgg	(GA) _n /(GTGA) _n	162-209	Dörnte, J. (2002)
	R – taatattctcctgtagccgt			

*F – прямий праймер.

**R – зворотний праймер.

Порядок роботи

1. Розрахувати кількість компонентів реакційної суміші для проведення ПЛР ДНК сортів картоплі, ліній цукрових буряків (табл. 4.4) та сортів ріпаку (табл. 4.5).

Таблиця 4.4. – Склад реакційної суміші для проведення ПЛР ДНК сортів картоплі та ліній цукрових буряків

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
10×ПЛР буфер*	1×
dNTP	250 мкМ
MgCl ₂	2,5 мМ
Taq-полімераза	1 од.
Праймер F	0,6 мкМ
Праймер R	0,6 мкМ
dH ₂ O	
Загальний об'єм реакції	20 мкл

Таблиця 4.5. – Склад реакційної суміші для проведення ПЛР ДНК сортів ріпаку

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
5×ПЛР буфер*+MgCl ₂	1×
dNTP (10 мМ)	200 мкМ
Taq-полімераза	1 од.
Праймер F	0,2 мкМ
Праймер R	0,2 мкМ
dH ₂ O	
Загальний об'єм реакції	20 мкл

*10 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 50 мМ KCl; 0,01% Тритон X-100

2. У пробірці 1,5 мл приготувати реакційну суміш. При розрахунку кількості компонентів ПЛР до фактичної кількості зразків додати ще один зразок для урахування можливих втрат (фактична кількість зразків +1 зразок).

3. Додати в кожену 0,2 мл пробірку по 17 мкл приготованої реакційної суміші відповідно до кількості зразків.

4. Додати в кожену пробірку по 3 мкл ДНК (концентрація не менше 20 нг/мкл). Операції проводити на льоду з метою уникнення утворення неспецифічних фрагментів реакції.

5. Центрифугувати для осадження крапель та бульбашок протягом 15 с за 7000 г. Помістити пробірки з реакційною сумішшю в

ампліфікатор та задати параметри ампліфікації ДНК сортів картоплі (табл. 4.6), ріпаку (табл. 4.7) та ліній цукрових буряків (табл. 4.8). Температура гібридизації праймерів наведена в таблиці 4.9.

Таблиця 4.6. – Параметри проведення ампліфікації ДНК сортів картоплі

Етап	Температура, °C	Час
Початкова денатурація	95	5 хв
Денатурація	95	45 с
Гібридизація праймерів	50-60	30 с
Елонгація	72	1,5 хв
Кінцева елонгація	72	7 хв
Кількість циклів – 40		

Таблиця 4.7. – Параметри проведення ампліфікації ДНК сортів ріпаку

Етап	Температура, °C	Час
Початкова денатурація	94	5 хв
Денатурація	94	45 с
Гібридизація праймерів	49-54	45 с
Елонгація	72	1 хв
Кінцева елонгація	72	10 хв
Кількість циклів – 35		

Таблиця 4.8. – Параметри проведення ампліфікації ДНК ліній цукрових буряків

Етап	Температура, °C	Час
Початкова денатурація	94*, 95	2*, 5 хв
Денатурація	93*, 95	30 с
Гібридизація праймерів	50-53,6	30 с
Елонгація	72	30 с
Кінцева елонгація	72	1, 5* хв
Кількість циклів – 35		

* для праймерів GZM086

Таблиця 4.9. – Температура гібридизації праймерів

Культура	Назва праймера	Температура гібридизації, °C
Картопля	STM 0019	50,0
	STM 3009	
	STM 3012	60,0
	STM 5136	
Ріпак	Ra3-H09	53,6
	Na12-A02	54,0
	FIT0-063	49,0
	Na10-B07	53,0
Цукрові буряки	SB04	51,0
	SB07	
	SB15	53,6
	GZM086	50,0

4. Електрофорез продуктів ампліфікації

Реактиви для електрофорезу

EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid; етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль дигідрат; $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$, EDTA ($M_m = 372,24$);

Tris (hydroxymethyl) aminomethane; 2-аміно-2-гідрооксиметил-1,3-пропандіол; тріс; TRIZMA – $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ($M_m = 121,10$);

легкоплавка агароза для електрофорезу;

борна кислота – H_3BO_3 ($M_m = 61,83$)

бромід етидію; етидій бромистий; EtBr; 2,7-діамін-10-етил-9-фенілфенантрідіум бромід; EtBr – $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{NBr}$ ($M_m = 394,3$) розчин 10 мг/мл [8].

Приготування розчинів

10×TBE-буфер

На 1 л розчину зважують 108 г Tris та 55 г борної кислоти та розчиняють в 800 мл дистильованої води. Після чого додають 40 мл 0,5 М EDTA (pH 8,0) та доводять дистильованою водою об'єм до 1 л. Зберігають у холодильнику при 4°C до 6 місяців.

0,5×TBE-буфер

Для приготування 1 л розчину в мірний циліндр вносять 50 мл 10×TBE-буфер (десятикратний TBE-буфер) та доводять дистильованою водою об'єм до 1 л, перемішують і переносять в колбу для зберігання. Зберігають при кімнатній температурі не більше 1 місяця.

Агарозний гель

Для приготування 100 мл 2% гелю зважують 2 г агарози або 4 г – для 4% гелю. Розчиняють агарозу у 70 мл 0,5×TBE-буферу шляхом нагрівання у мікрохвильовій печі або киплячій водяній бані та доводять об'єм до 100 мл. Після повного розчинення агарози, охолоджують при кімнатній температурі до 60°C. Додають розчин етидію броміду до кінцевої концентрації 1 мкг/мл. Встановлюють гребінку в камеру для заливки гелів та заливають гель товщиною близько 4 мм. Після полімеризації гелю гребінку видаляють попередньо заливши поверх гелю розчин 0,5×TBE-буферу шаром 1 мм.

Порядок роботи

1. Пластину гелю помістити в електрофорезну камеру приладу для горизонтального електрофорезу, заповнену 0,5×TBE-буфером.

2. Приготувати розчин 1×буферу для нанесення (однократний буфер): для нанесення одного зразка продуктів ампліфікації змішати 1,66 мкл шестикратного буферу для нанесення (6×буфер) (0,25% бромфенолового синього, 0,25% ксиленціанолу, 30% гліцерину) та 3,34 деіонізованої води.

3. З кожної мікроцентрифужної пробірки відібрати по 5 мкл продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та змішати з

5 мкл 1×буферу для нанесення, уникаючи утворення бульбашок. Отриманий розчин (10 мкл) та маркер молекулярної маси ДНК внести в лунки гелю.

4. Провести електрофорез продуктів ампліфікації в 2% агарозному гелі (сорт ріпаку та лінії цукрових буряків) або 4% (сорт картоплі) у 0,5×TBE-буфері протягом 1,5 год за напруженості електричного поля 5 В/см у напрямку від катода до анода.

5. Після закінчення електрофорезу гель помістити на фільтр транслюмінатора з лампою ультрафіолетового світла (254-310 нм). При опроміненні гелю ультрафіолетовим світлом продукти ПЛР проявляються у вигляді смуг на відповідних доріжках.

6. Результати візуалізації задокументувати за допомогою цифрової камери або інших систем документування гелю.

5. Визначення генетичних дистанцій на основі поліморфізму ДНК

1. На основі отриманих електрофореграм визначити розмір ампліконів за допомогою комп'ютерної програми TotalLab або іншого аналогічного програмного забезпечення (рис. 1).

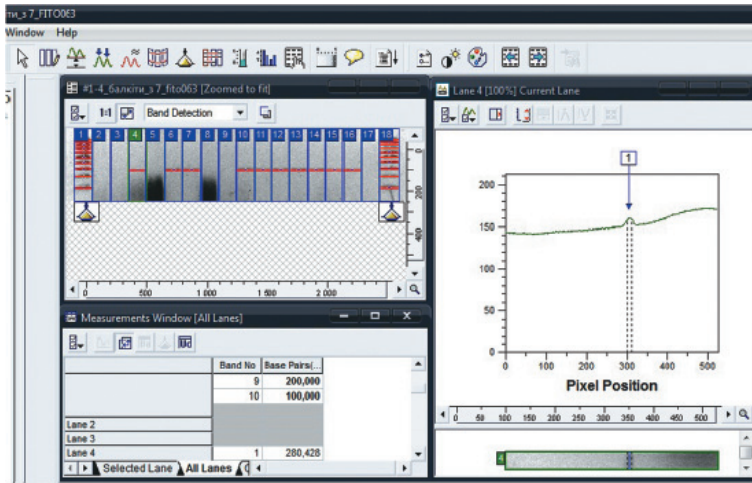


Рис. 1. Робоче вікно програми TotalLab TL120 (тестова версія)

2. Результати аналізу в програмі TotalLab зберегти в програмі Excel, розміри ампліконів записати в п.н. з урахуванням мотиву мікросателіта (рис. 2).

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with the following data:

Lane	Band No	Base Pairs (kb)	Microsatellite Motif
Lane 1	1	1000000	
Lane 1	2	900000	
Lane 1	3	800000	
Lane 1	4	700000	
Lane 1	5	600000	
Lane 1	6	500000	
Lane 1	7	400000	
Lane 1	8	300000	
Lane 1	9	200000	
Lane 1	10	100000	
Lane 2			
Lane 3			
Lane 4	1	280	N#1
Lane 6	1	286	N#2
Lane 7	1	286	N#2
Lane 10	1	286	N#3
Lane 11	1	286	N#3

Рис. 2. Форма документування розмірів ампліконів у програмі Excel

3. Відповідно до визначених розмірів ампліконів сформувати матрицю, у якій присутність/відсутність певного амплікону у досліджуваних сортах позначити 1/0 [13; 22] (рис 3).

	Var1	Var2	Var3	Var4	Var5	Var6	Var7	Var8	Var9	Var10	Var11	Var12	Var13	Var14	Var15	Var16
Сортів/Роз.																
Ні Топка	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ні Топка	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Давид	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Давид	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Гарс	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Гарс	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Чорний волець	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Астер	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Нельсон	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

Рис. 3. Робоче вікно програми STATISTICA 12 (тестова версія) із матрицею наявності/відсутності ампліконів

4. На основі побудованої матриці для диференціювання сортів і ліній провести кластерний аналіз за допомогою незваженого методу середніх зв'язків з обрахунком Евклідових відстаней з використанням програми STATISTICA [4; 12; 14] (рис. 4).

Cluster Analysis using Ward's clustering: Unsupervised

Quick Advanced

Input file: Raw data

Cluster: Variables (optional)

Agglomeration (linkage) rule: Unweighted pair-group average

Distance measure: Euclidean distances

Batch processing and reporting

OK Cancel Options

Рис. 4. Робоче вікно програми STATISTICA 12 (тестова версія) проведення кластерного аналізу

5. На наступному етапі вибрати спосіб представлення результатів кластерного аналізу: графічне або цифрове представлення даних (рис. 5) [6; 21].

6. Результати кластерного аналізу можуть бути представлені у вигляді дендрограми, яка дозволяє зрозуміти взаємозв'язки між сортами (рис. 6) або таблиці цифрових значень генетичних дистанцій, що використовується для прийняття рішення щодо відмінності сортів (рис. 7).

7. Для прийняття рішення щодо відмінності об'єктів (сортів, ліній) необхідно зважати на наступну умову: абсолютно однаковими вважають об'єкти із значенням генетичних дистанцій, які дорівнюють «нуль», а різними – із значенням більше «нуля».

Таким чином, для оцінки генетичного різноманіття сортів картоплі, ріпаку та ліній цукрових буряків описано застосування SSR маркерів з метою визначення відмінності генотипів при проведенні

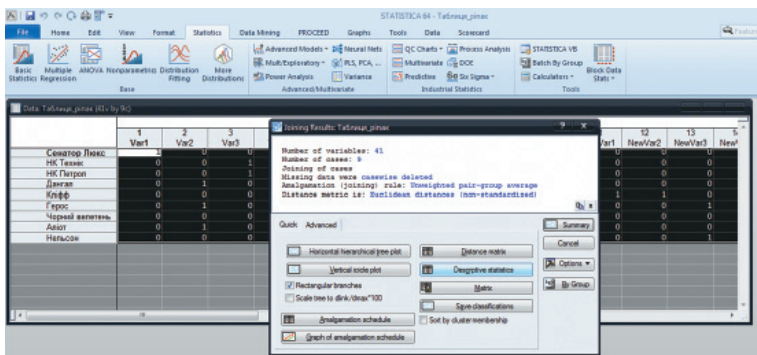


Рис. 5. Робоче вікно програми STATISTICA 12 (тестова версія) проведення кластерного аналізу – варіанти представлення кластерного аналізу

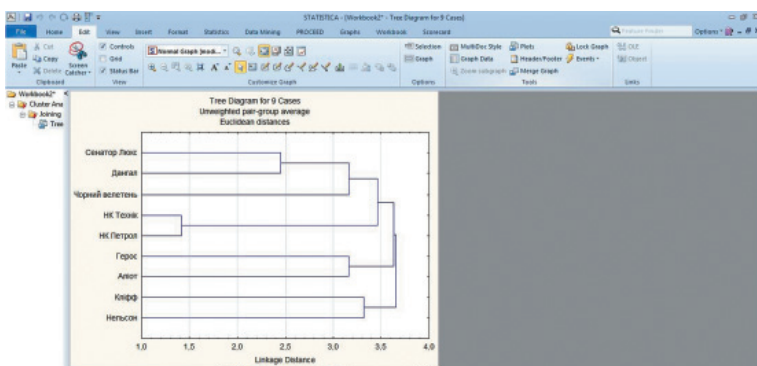


Рис. 6. Дендрограма сортів ріпаку за результатами кластерного аналізу за чотирма SSR маркерами в програмі STATISTICA 12 (тестова версія)

Case No.	Сенатор Рікс	НК Тікс	НК Пілтон	Діагат	Кікс	Гікс	Чорний восток	Аніт	Ніксон
Сенатор Рікс	0.00	3.46	3.46	2.45	3.74	3.74	3.16	3.74	3.61
НК Тікс	3.46	0.00	1.41	3.46	3.74	3.74	3.46	3.74	3.61
НК Пілтон	3.46	1.41	0.00	3.46	3.74	3.74	3.46	3.74	3.61
Діагат	2.45	3.46	3.46	0.00	3.74	3.74	3.16	3.46	3.61
Кікс	3.74	3.74	3.74	3.74	0.00	4.00	3.46	3.46	3.61
Гікс	3.74	3.74	3.74	3.46	4.00	0.00	3.46	3.16	3.61
Чорний восток	3.16	3.46	3.46	3.16	3.46	3.46	0.00	3.46	3.61
Аніт	3.74	3.74	3.74	3.46	3.46	3.16	3.46	0.00	3.61
Ніксон	3.61	3.61	3.61	3.61	3.61	3.61	3.61	3.61	0.00

Рис. 7. Генетичні дистанції між сортами ріпаку за результатами кластерного аналізу за чотирма SSR маркерами в програмі STATISTICA 12 (тестова версія)

експертизи на ВОС, проведенні селекційної роботи, а також для управління колекціями сортів.

Використання та впровадження розробленої методики підвищить якість отриманих результатів щодо визначення відмінності сортів та ліній, а також є ефективним підґрунтям для подальшого використання аналізу в системі експертизи сортів рослин. Розроб-

ка ефективних методів експертизи сортів рослин є одним з найактуальніших завдань, оскільки результати цієї експертизи тісно пов'язані з проблемами об'єктивної оцінки сортового матеріалу, захисту авторських прав.

Список використаних літературних джерел

1. Антонова О. Ю., Гавриленко Т.А. Полиморфизм последовательностей оргanelьных ДНК видов картофеля. *Генетика популяций и эволюция*. 2006. Т.4, №1. С. 2-10.
2. Волкова Н. Е. Молекулярні маркери в генетиці, селекції та насінництві бобових культур (огляд). *Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортівивчення*, Одеса, 2015. № 26. С. 99-106.
3. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. М.: Мир, 1991. 408 с.
4. Дроздов В. И. Инструкция по использованию пакета Statistica 6.0. Курск: Издательство ЮЗГУ, 2010. 74 с.
5. Епринцев А. П. Идентификация и исследование экспрессии генов / Епринцев А. П., Попов В. Н., Федорин Д. Н. Воронеж, 2008. 64 с.
6. Ермантраут Е. Р., Присяжнюк О. І., Шевченко І. Л. Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних в пакеті STATISTICA 6.0. К.: ПоліграфКонсалтинг, 2007. 55 с.
7. Методика проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні. Методи визначення показників якості продукції рослинництва. Київ, 2016. 158 с.
8. Роїк М. В., Сиволап Ю.М., Петюх Г.П. та ін. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду *BETA* L. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Київ, 2007. 27 с.
9. Chung Y. S., Palta J., Bamberg J., Jansky S. Potential molecular markers associated with tuber calcium content in wild potato germplasm. *Crop Science*. 2016. Vol. 56, No. 2. P. 576-584.
10. Côté M.-J., Leduc L., Reid A. Evaluation of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Established in Europe as a Method for the Identification of Potato Varieties Grown in Canada. *Am. J. Potato Res.* 2013. Vol. 90. P. 340-350. <http://doi.org/10.1007/s12230-013-9310-7>.
11. Čurn V., Žaludová J. Fingerprinting of oilseed rape cultivars. *Advances in Botanical Research*. 2007. 45. P. 155-179.
12. Dong D., Fu X., Yuan F. et al. Genetic diversity and population structure of vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in China as revealed by SSR markers. *Genetic resources and crop evolution*. 2014. 61(1). P. 173-183. <http://doi.org/10.1007/s10722-013-0024-y>.
13. Everitt B. S., Landau S., Leese M., Stahl D. Cluster Analysis. (5th ed.). Chichester: Wiley, 2011. 346 p.
14. Fortin, M. J., Dale, M. R., & Ver Hoef, J. M. Spatial analysis in ecology. Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. 2002. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118445112.stat07766.pub2/full>.
15. Ghebresslassie B. M., Githiri S. M., Mehari T. et al. Genetic diversity assessment of farmers' and improved potato (*Solanum tuberosum*) cultivars from Eritrea using simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*. 2016. T. 15, No. 35. P. 1883-1891.
16. Kuhl J. C., Novy R. G., Whitworth J. L. Development of molecular markers closely linked to the Potato leafroll virus resistance gene, Rlretb, for use in marker-assisted selection. *American journal of potato research*. 2016. Vol. 93, No. 3. P. 203-212.
17. Li L. Characterization of genetic identities and relationships among brassica napus using AFLP and SSR: Degree of Master of Science in Biotechnology / Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, 2010.
18. Li L., Wanapu C., Huang X. et al. Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of *Brassica napus* hybrids. *Journal of Agricultural Science*. 2011. 3(3). P. 101.
19. Liao H., Guo H. Using ssr to evaluate the genetic diversity of potato cultivars from yunnan province (SW China). *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2014. 56/1. P. 16–27. <http://doi.org/10.2478/abcsb-2014-0003>.

20. McGrath J. M., Trebbi D., Fenwick A. et al. An open-source first-generation molecular genetic map from a sugarbeet table beet cross and its extension to physical mapping. *Crop Science*. 2007. 47(Supplement_1). P. 27.
21. Muhinyuza J. B., Shimelis H., Melis R. Assessment of genetic relationship of promising potato genotypes grown in Rwanda using SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*. 2015. Vol. 9, No. 8. P. 696.
22. Namorato H. Miranda G.V., de Souza L.V. et al. Comparing Biplot Multivariate Analyses with Eberhart and Russell' method for genotype x environment interaction. *Crop. Breeding and Applied Biotechnology*. 2009. No. 9. P. 299-307.
23. Reid A., Hof L. Esselink D., Vosman B. Potato cultivar genome analysis. *Methods in molecular biology, plant pathology*. 2009. Vol. 508. P. 295-308.
24. Richards C. M., Brownson M., Mitchell S. E. et al. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (*Beta vulgaris*). *Molecular Ecology Notes*. 2004. 4(2). P. 243-245. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00630.x>.
25. Schönhals E. M., Ortega F., Barandalla L. et al. Identification and reproducibility of diagnostic DNA markers for tuber starch and yield optimization in a novel association mapping population of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2016. Vol. 129, No. 4. P. 767-785.
26. Soengas P., Carrea M. E., Francisco M. et al. Genetic structure and diversity of a collection of *Brassica rapa* subsp. *rapa* L. revealed by simple sequence repeat markers. *The Journal of Agricultural Science*. 2011. 149(5). P. 617-624.
27. Tierno R. Ignacio Ruiz de Galarreta J. Characterization of high anthocyanin-producing tetraploid potato cultivars selected for breeding using morphological traits and microsatellite markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 2015. P. 1-10. doi: 10.1017/S1479262115000477.
28. Wu W., Zhou B., Luo D. et al. Development of simple sequence repeat (SSR) markers that are polymorphic between cultivars in *Brassica rapa* subsp. *rapa*. *African Journal of Biotechnology*. 2012. 11(11). P. 2654-2660.

Для нотаток

Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських культур за допомогою SSR маркерів

Методичні рекомендації

Методичні рекомендації розглянуті, схвалені та рекомендовані до видання
Вченою радою Українського інституту експертизи сортів рослин,
протокол № 1 від «01» лютого 2019 року.

Методичні рекомендації підготували: Л. М. Присяжнюк, С. О. Ткачик, Ю. В. Шитікова,
О. В. Піскова, І. О. Діхтяр, О. В. Топчій, А. П. Іваницька, С. О. Ляшенко, С. Л. Чухлеб,
Український інститут експертизи сортів рослин.

Комп'ютерне верстання: Бойко А. І.

Формат 64×84/16. Папір крейдований.
Друк цифровий. Гарнітура OfficinaSans.
Ум. друк. арк. . Обл.-вид. арк. .
Наклад 50 прим. Зам. №

Віддруковано з оригіналів замовника
ФОП Корзун Д.Ю.

Видавець ТОВ «ТВОРИ»

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру
видавців, виготовлювачів і розповсюджувачів видавничої продукції
серія ДК № 6188 від 18.05.2018 р.
21027, м. Вінниця, вул. Келецька, 51А, прим. 143.
Тел.: (0432) 69-67-69, 603-000

e-mail: info@tvoru.com.ua
<http://www.tvoru.com.ua>

