

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ,
ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ ЕКСПЕРТИЗИ СОРТІВ РОСЛИН

**Застосування ДНК маркерів
для визначення S- та C-типів
стерильності кукурудзи звичайної
(*Zea mays* L.) в кваліфікаційній експертизі
на відмінність, однорідність та стабільність**
Науково-методичні рекомендації

Вінниця
ТОВ «ТВОРИ»
2019

Застосування ДНК маркерів для визначення S- та C-типів стерильності кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) в кваліфікаційній експертизі на відмінність, однорідність та стабільність

Рецензенти: Карпук Л. М. – доктор сільськогосподарських наук, професор, професор кафедри землеробства, агрохімії та ґрунтознавства, Білоцерківський національний аграрний університет;

Білоус С. Ю. – кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри ботаніки, дендрології та лісової селекції, Національний університет біоресурсів і природокористування України.

З 36 Застосування ДНК маркерів для визначення S- та C-типів стерильності кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) в кваліфікаційній експертизі на відмінність, однорідність та стабільність: наук. метод. реком. / Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України; Український інститут експертизи сортів рослин. Вінниця : ТОВ «ТВОРИ», 2019. 24 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 ДНК маркерів для визначення двох типів цитоплазматичної чоловічої стерильності у кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) з метою оцінки ліній, що проходять державну кваліфікаційну експертизу сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність. Описано спосіб визначення якості ДНК за допомогою сучасного обладнання та показано практичне застосування інформаційних технологій для молекулярно-генетичного аналізу.

Рекомендації призначені для селекціонерів, спеціалістів наукових установ, викладачів університетів та аспірантів, які вивчають теоретичні та методологічні основи сучасної селекції, експертизи сортів рослин, проводять роботу пов'язану із використанням ДНК маркерів для оцінки селекційних матеріалів та нових ліній.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
1. ЕКСТРАКЦІЯ ДНК З РОСЛИННИХ ТКАНИН	7
2. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТА ЧИСТОТИ ДНК	8
3. УМОВИ ПРОВЕДЕННЯ ПЛР	11
4. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ ПРОДУКТІВ ПЛР В АГАРОЗНОМУ ГЕЛІ	13
5. ВИЗНАЧЕННЯ S- ТА C-ТИПІВ СТЕРИЛЬНОСТІ У ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ	15
6. ПРОВЕДЕННЯ ПЛР <i>IN SILICO</i> ЗА ДОПОМОГОЮ КОМП'ЮТЕРНОЇ ПРОГРАМИ SNARGENE 5.0.5	17
ВИСНОВКИ	21
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	22

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

СТАВ - cetyltrimethylammonium bromide

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфати

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

ВОС – кваліфікаційна експертиза на відмінність, однорідність, стабільність

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

нм - нанометр

пн – пари нуклеотидів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

TBE – тріс-боратний буфер для електрофорезу

TE – буфер для розчинення ДНК

ЦЧС - цитоплазматична чоловіча стерильність

Вступ

Цитоплазматична чоловіча стерильність у рослин, відкрита в п'ятдесяті роки 20-го століття, знайшла широке застосування в селекційній практиці як генетичний спосіб кастрації материнських рослин гібридів кукурудзи, пшениці, рису, цукрових буряків та ін. [18, 22, 25]. Ця ознака успадковується по материнській лінії, що свідчить про її нехромосомну природу. Знання про молекулярні структури та механізми, що лежать в основі ЦЧС, значно зросли з розвитком молекулярно-генетичних методів аналізу. Показано, що мутації, відповідальні за ЦЧС, знаходяться в ДНК мітохондрій (мтДНК) у багатьох видів рослин [20, 21, 27]. Результати дослідження структури геному мітохондрій та експресії генів дозволили застосовувати їх для визначення основних типів цитоплазми кукурудзи.

В селекції кукурудзи найширше використовують три типи ЦЧС: Т – техаський тип, S – молдавський тип та С – парагвайський тип або чарруа. ЦЧС проявляється в тому випадку, коли в цитоплазмі присутній фактор стерильності, а в ядрі знаходяться рецесивні алелі генів відновлення Rf (restoration of fertility) [7]. У процесі селекції для визначення типів стерильності кукурудзи застосовують тестери з відомими Rf генами, які відновлюють певний тип ЦЧС. Проте, аналізуючі схрещування – це трудомістка процедура, яка потребує значних витрат часу та матеріальних ресурсів [6, 8, 9].

Методикою проведення кваліфікаційної експертизи кукурудзи звичайної на ВОС передбачено визначення ознак часу цвітіння волоті та антоціанового забарвлення пиляків. Відомо, що здатність до утворення пиляків кукурудзи може залежати від факторів навколишнього середовища, а також часу спостереження [12, 17, 28, 30]. Однак вказані ознаки не дозволяють повною мірою візуально визначити відмінність між лінією і її стерильним аналогом. Це створює додаткові труднощі для об'єктивної оцінки ліній, що проходять кваліфікаційну експертизу. Отже, актуальним є залучення швидких та надійних методів ідентифікації основних типів стерильності в насіннєвому матеріалі та у вегетуючих рослинах.

Поліморфізм мтДНК можна оцінити за допомогою молекулярно-генетичних маркерів. Так, описано застосування RFLP (restriction fragment length polymorphism) аналізу та методик з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), було розроблено специфічні праймери для ідентифікації трьох основних типів ЦЧС на основі сиквенсу мтДНК [17, 20, 26, 27]. За допомогою ДНК маркерів проводили дослідження з оцінки молекулярно-генетичного поліморфізму генів мітохондріону кукурудзи та визначення нових субтипів S стерильності у кукурудзи [15, 29,

30]. Зважаючи на те, що використання Т типу на сьогоднішній день обмежено у зв'язку із його чутливістю до *Helminthosporium maydis*, тому найпоширенішими є S та С типи [27]. Отже, актуальним є визначення С- та S-типів стерильності у кукурудзи за допомогою ДНК маркерів для використання в експертизі сортів на ВОС.

У представлених рекомендаціях описано умови та особливості аналізу ДНК ліній кукурудзи на основі ПЛР, наведено метод визначення концентрації ДНК за допомогою мультимодального планшетного рідеру та проведення ПЛР *in silico*.

1. Екстракція ДНК з рослинних тканин

Методи виділення ДНК з рослинних тканин включають наступні етапи: 1) лізис клітин; 2) осадження білків; 3) осадження ДНК з розчину спиртом; 4) розчинення осаду в буферному розчині. У ролі лізуючого агенту застосовують СТАВ, який при певній концентрації солі (NaCl) утворює нерозчинний комплекс з нуклеїновими кислотами, осадження білків здійснюють за допомогою хлороформу, осадження ДНК – ізопропілового спирту [3, 5, 14, 23].

Реактиви для виділення ДНК

- **Лізуючий розчин** (на 200 мл: СТАВ – 4 г; NaCl - 16,4 г; Tris – 3,15 г; EDTA – 1,5 г, рН розчину 8,0). Кінцеві концентрації компонентів: 20 mM EDTA; 100mM Tris-HCl; 1,4 M NaCl; 2% СТАВ. Зберігають за температури 4°C до 4 місяців.

- **Розчин для преципітації** (на 200 мл: СТАВ – 1 г; NaCl – 0,5 г, рН розчину 8,0). Кінцеві концентрації компонентів: 0,5% СТАВ; 0,04 M NaCl. Зберігають розчин при 4°C до 4 місяців.

- **Хлороформ**; трихлорметан; метилтрихлорид – CHCl_3 ($M_m = 119,37$).

- **Розчин 1,2 M NaCl** (на 100 мл: NaCl – 7 г). Зберігають при кімнатній температурі до 6 місяців.

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

- **Розчин для відмивання** (70% етиловий спирт). Зберігають розчин при кімнатній температурі до 6 місяців.

- **Розчин TE** (на 200 мл: 0,5 M EDTA рН 8,0 – 400 мкл; 1 M Tris-HCl рН 8,0 – 1 мл). Кінцеві концентрації TE розчину: 1mM EDTA рН 8,0; 10 mM Tris-HCl рН 8,0. Зберігають розчин при 4°C до 6 місяців.

- **Розчин 0,5 M EDTA** (на 200 мл: 37,22 г EDTA, рН розчину 8,0). Зберігають за температури 4°C до 6 місяців [14].

- рН всіх розчинів регулюють за допомогою 1 M NaOH.

Проведення екстракції ДНК

1. Для виділення ДНК пророщують по 10 насінин кожної лінії кукурудзи протягом 5 днів за ДСТУ 4138-2002 «Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості» [11].

2. Гомогенізують наважку зразку 50 мг з 500 мкл **Лізуючого розчину** та переносять у мікроцентрифужну пробірку. Додають 300 мкл стерильної деіонізованої води та вортексують протягом 30 с.

3. Інкубують за температури 65°C протягом 45 хв. Після цього центрифугують за 13000g протягом 10 хв.

4. Весь супернатант ~300 мкл переносять у нову мікроцентрифужну пробірку та додають **Хлороформ** у співвідношенні 1:1 до відібраного супернатанту, обережно перемішують протягом 30 с.

5. Після центрифугування за 13000g 10 хв переносять верхній шар (~250 мкл) у нову мікроцентрифужну пробірку та повторюють п. 5.

6. Після центрифугування за 13000g протягом 5 хв додають 2 об'єми (~500 мкл) **Розчину для преципітації** та обережно перемішують.

7. Інкубують 60 хв за кімнатної температури.

8. Центрифугують за 13000g протягом 5 хв та обережно видаляють супернатант не зачіпаючи осад (преципітат).

9. Розчиняють преципітат в 350 мкл 1,2 М NaCl та додають 0,6 об'єму (210 мкл) охолодженого **Ізопропілового спирту**, обережно перемішують.

10. Центрифугують за 13000 g протягом 10 хв, після чого видаляють супернатант, не зачіпаючи осад. До отриманого осаду додають 500 мкл **70% етилового спирту**, обережно перемішують.

11. Центрифугують за 13000 g протягом 10 хв, видаляють супернатант. Осад підсушують за 60°C протягом 30 хв.

12. Сухий осад, в якому міститься ДНК, розчиняють в 50 мкл ТЕ-буферу. Отриману ДНК одразу використовують для проведення ПЛР або зберігають за температури +4°C не більше одного місяця.

2. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТА ЧИСТОТИ ДНК

Нуклеїнові кислоти поглинають ультрафіолетове випромінювання в області спектру 240–290 нм. Концентрацію ДНК зазвичай визначають при довжині хвилі 260 нм. Для оцінки чистоти препарату ДНК проводять вимірювання оптичної щільності розчину при довжинах хвиль 260, 280 і 235 нм, тобто на максимумах поглинання розчинів ДНК, білків і полісахаридів, відповідно. Значення співвідношення A260/280 для чистої ДНК становить більше 1,8, значення A260/235 – більше за 2,2 [1, 4].

Визначення концентрації ДНК, окрім спектрофотометра, проводять із застосуванням мультимодального платшентного рідера CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Німеччина), який дозволяє проводити вимірювання в мікрооб'ємах розчинів нуклеїнових кислот та одночасно на трьох довжинах хвиль.

Визначення концентрації ДНК за допомогою мультифункціонального мікропланшетного рідера CLARIOstar

1. Запустити прилад та програмне забезпечення «CLARIOstar» на комп'ютері, вибрати користувача «User» та натиснути «Run».

2. Підготувати планшет для вимірювання. Промити дистильованою водою та промокнути фільтрувальним папером. Нанести на стільнички планшета (права частина – треки 10 та 11) зразки – розчин ДНК і контроль – dH_2O по 2 мкл.

3. Закрити відкидну кришку планшета, кнопкою на передній панелі приладу **«in/out»** викликати каретку та поставити планшет на каретку приладу. Впевнитися, що в активному вікні обрана вкладка **LVis Plate** та натиснути **«Start measurement»**.

4. У наступному вікні вибрати вид аналізу **«dsDNA Adsorbance Spectra»** та натиснути **«Ok»**.

5. Для позначення зразків у діалоговому вікні **«Start Measurement-dsDNA»** натиснути **«Change Layout»**. У вкладці, яка відкриється будуть відображені позначення попереднього аналізу. Щоб змінити розташування зразків та контролю, потрібно видалити попередні позначення – натиснути кнопку **«Empty»** та двічі натиснути на відповідних комірках лівою кнопкою миші. Для позначення контролю натиснути кнопку **«Blank»** та позначити розташування контролю у комірці відповідно до його нанесення на планшеті. Для позначення зразків натиснути **«Sample»** та позначити зразки у комірках відповідно до їхнього нанесення на планшеті. Після позначення натиснути **«Start measurement»**.

6. Для позначення зразків вибрати вкладку **«Sample ID/Dilution Factors»** та ввести у відповідні рядки назви зразків.

7. Щоб розпочати аналіз – натиснути **«Start measurement»**. Аналіз триває 15 с, про що сповіщається у рядку завантаження діалогового вікна. Про завершення аналізу сповіщає звуковий сигнал та активуються кнопки в діалоговому меню. Для відображення результатів аналізу натиснути **«Open Last Test Run»**.

8. Ліворуч у діалоговому вікні, яке відкриється, для коректного відображення результатів правою кнопкою миші натиснути **«dsDNA concentration»**, вибрати із контекстного меню **«Change calculation»**. У вікні, яке відкриється у меню, вибрати пункт **«Blank corrected based on Row Data»** з метою відображення результатів відносно контролю. Після чого натиснути **«Ok»**.

9. Для відображення чистоти ДНК відносно контролю за відношення довжини хвиль 260/280 нм ліворуч у вікні результатів правою кнопкою миші натиснути на параметрі у **«Calculation→Ratio 260/280»**, вибрати у контекстному меню **«Change calculation»**. У вікні, яке відкриється у верхньому рядку меню **«First input data»**, вибрати пункт **«Blank corrected based on Row Data»** та навпроти нього встановити довжину хвилі 260 нм. У нижньому рядку меню **«Second input data»**, яке розкривається цього вікна також вибрати пункт **«Blank corrected based on Row Data»** та навпроти нього встановити довжину хвилі 280 нм для відображення результатів відносно контролю. Після чого натиснути **«Ok»**.

10. Зліва встановити кольорові прапорці для відображення чистоти ДНК **«Ratio 260/280»** та концентрації – **«User defined formula 260 nm»**.

11. У таблиці праворуч будуть відображені результати аналізу чистоти та концентрації ДНК. Для того, щоб продивитись графічне зображення результатів аналізу необхідно вибрати один зразок або їхній діапазон в таблиці та натиснути **«Spectrum»**.

12. Для передачі результатів аналізу в MS Excel натиснути на **«Excel Export»**.

13. Для перегляду результатів попереднього аналізу натиснути **«Open»** вибрати результати аналізу за датою. Для коректного відображення результатів аналізу необхідно повторити пп. 12–15.

3. Умови проведення ПЛР

Використовують дві пари праймерів до генів мітохондрій за двома основними типами стерильності [27]. Характеристики праймерів та склад реакційної суміші наведено в таблиці 1 та 2.

Таблиця 1.

Характеристика праймерів

Тип ЦЧС	Нуклеотидна послідовність праймерів 5'→3'	Розмір амплікону, пн	Послідовність ДНК (GenBank)
ЦЧС-С	F* – ATGCTAATGGTGTCCGATTCC R** – AGCATCATCCACATTCGCTAG	398	S81074
ЦЧС-S	F – CAACTTATTACGAGGCTGATGC R – AGTTCGTCCTATATACCCGTAC	799	AF008647

*F – прямий праймер.

**R – зворотний праймер.

Таблиця 2.

Склад реакційної суміші
для проведення ПЛР ДНК ліній кукурудзи

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

*10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,01% Тритон X-100; 20 mM MgCl₂

Проведення ПЛР ДНК ліній кукурудзи

1. Розраховують кількість компонентів реакційної суміші для проведення ПЛР відповідно до наведених в таблиці 2 кінцевих концентрацій.

2. Реакційну суміш готують у пробірці 1,5 мл. Розрахунок компонентів ПЛР здійснюють з урахуванням можливих втрат (фактична кількість зразків + 1 зразок).

3. Додають у кожну 0,2 мл пробірку по 9 мкл реакційної суміші відповідно до кількості зразків.

4. Після цього в кожну пробірку додають по 1 мкл зразків ДНК (концентрація 100 нг/мкл). Всі операції бажано проводити на льоду з метою уникнення утворення неспецифічних фрагментів реакції.

5. Готову реакційну суміш із зразками ДНК центрифугують для осадження крапель та бульбашок протягом 15 с за 7000 g. Пробірки з реакційною сумішшю поміщають в ампліфікатор та задають параметри ампліфікації ДНК ліній кукурудзи (табл. 3).

Таблиця 3.

Параметри ПЛР ДНК ліній кукурудзи

Етап	Температура, °C	Час
Початкова денатурація	96	2 хв
Денатурація	94	45 с
Гібридизація праймерів	55	30 с
Елонгація	72	1 хв
Кінцева елонгація	72	2 хв
Кількість циклів – 30		

4. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ ПРОДУКТІВ ПЛР в агарозному гелі

Реактиви для електрофорезу

10×ТВЕ-буфер (стоковий розчин) (на 1 л: 108 г Tris, 55 г борної кислоти. Після розчинення додають 40 мл 0,5 М ЕДТА (рН 8,0)). Зберігають у холодильнику при 4°C до 6 місяців.

0,5×ТВЕ-буфер (робочий розчин) (на 1 л розчину: 50 мл **10×ТВЕ-буфер** (десятикратний ТВЕ-буфер), доводять об'єм до 1 л дистильованою водою). Зберігають при кімнатній температурі не більше 1 місяця.

легкоплавка агароза для електрофорезу;

етидій бромистий; бромід етидію; EtBr; 2,7-діамін-10-етил-9-фенілфенантрідіум бромід; EtBr – C₂₁H₂₀NBr (Мм=394,3) розчин 10 мг/мл [14].

агарозний гель 3% (на 100 мл: 3 г легкоплавкої агарози для електрофорезу розчинити в 0,5×ТВЕ-буфері шляхом нагрівання у мікрохвильовій печі або киплячій водяній бані). Приготований гель одразу використовують для проведення електрофорезу.

Проведення горизонтального електрофорезу продуктів ПЛР

1. Після повного розчинення агарози, гель охолоджують при кімнатній температурі до 60°C. Додають розчин бромистого етидію 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×ТВЕ-буферу шаром 1 мм.

2. Гель на підложці поміщають в електрофорезну камеру приладу для горизонтального електрофорезу, заповнену 0,5×ТВЕ-буфером.

3. Готують розчин 1×буферу для нанесення (однократний буфер): для кожного зразка змішують 1,66 мкл 6×буферу (шестикратний буфер для нанесення*) та 3,34 мкл деіонізованої води.

*Примітка: комерційний реактив або 0,25% бромфеноловий синій, 0,25% ксиленціанол, 30% гліцерин.

4. Відбирають по 5 мкл продуктів ПЛР та змішують з 5 мкл 1×буферу для нанесення, уникаючи утворення бульбашок. В лунки гелю вносять отриманий розчин (10 мкл) та маркер молекулярної маси ДНК.

5. Електрофорез продуктів ампліфікації проводять протягом 1,5 год за напруженості електричного поля 5 В/см у напрямку від катода до анода в 0,5×ТВЕ-буфері.

6. Для візуалізації продуктів ПЛР після закінчення електрофорезу гель поміщають на фільтр транслюмінатора з лампою ультрафіолетового світла (254–310 нм). Результати електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації документують за допомогою цифрової камери або інших систем документування гелю.

7. На основі отриманих електрофореграм визначити розмір ампліконів за допомогою комп'ютерної програми TotalLab або іншого аналогічного програмного забезпечення [13].

5. Визначення S- та C-типів стерильності у ліній кукурудзи

Рослинний матеріал кукурудзи, пов'язаний з S та C типами стерильності включав по: 4 пари стерильних ліній-аналогів та їхніх закріплювачів, 3 стерильних ліній-аналога C типу та 3 стерильних ліній-аналога S типу.

У результаті аналізу ліній кукурудзи, які в польових умовах продемонстрували ознаки стерильності, за праймерами до S типу стерильності були отримані амплікони очікуваного розміру 799 пн (рис. 1 а та рис. 1 б).

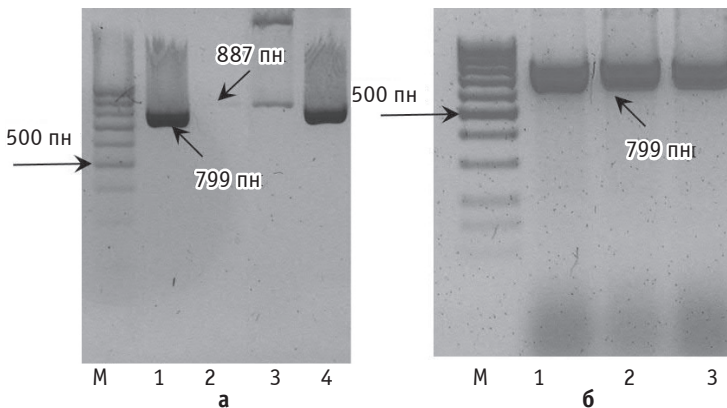


Рис. 1. Результати ПЛР ліній кукурудзи з S-типом стерильності: М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O'GeneRuler (Thermo Scientific); а) 1, 4 – стерильні ліній-аналоги за S типом; 2, 3 – лінії з нормальною цитоплазмою; б) 1-3 – стерильні лінії за S-типом

Як показано на рисунку 1, лінії кукурудзи, які мають стерильну цитоплазму за S типом продемонстрували наявність фрагмента ДНК розміром 799 пн. Амплікон 799 пн був ідентифікований у стерильних ліній-аналогів: L17 та L57. У ліній з нормальною цитоплазмою, які є закріплювачами стерильності, були виявлені амплікони різного розміру. У лінії L18 виявлено фрагмент ДНК розміром 887 пн, у лінії L56 – 879 пн. У всіх стерильних ліній з S типом цитоплазми (L19, L53 та L86) ідентифіковано амплікони очікуваного розміру 799 пн (рис. 1 б).

За результатами ПЛР аналізу ліній з C типом стерильності, отримані амплікони 398 пн (рис. 2 а та 2 б).

Відповідно до отриманих даних, стерильні ліній-аналоги за C типом (L55 та L76) продемонстрували наявність характерного фрагменту 398 пн. У ліній L54 та L77 з нормальною цитоплазмою виявлено по два амплікони розмірами 398 та 346 пн. Відповідно до результатів, отриманих різними авторами, у ліній, які характеризуються нормальним типом цитоплазми, не було ви-

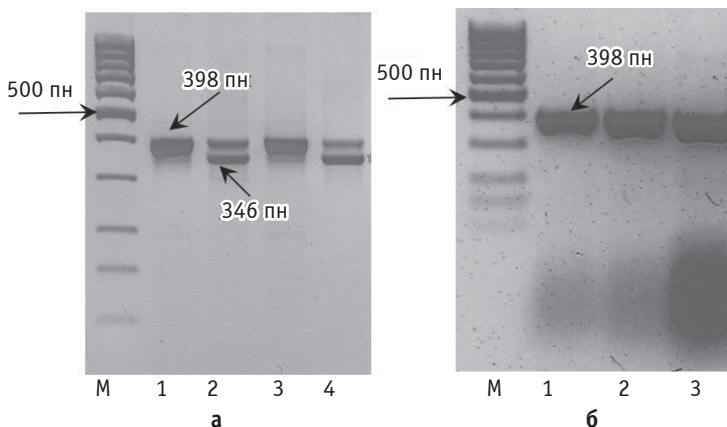


Рис. 2. Результати ПЛР ліній кукурудзи з С-типом стерильності: М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder O'GeneRuler (Thermo Scientific); а) 1, 2 – стерильні аналоги за S типом; 2, 4 – лінії з нормальною цитоплазмою; б) 1-3 – стерильні лінії за С-типом

явлено жодних ампліконів за маркерами до S та C стерильності [15, 27, 30]. Отже, для перевірки гіпотези про наявність певної закономірності щодо ідентифікованих ампліконів у фертильних ліній за маркерами до C та S типу стерильності, нами проведено ПЛР *in silico* на основі двох цитотипів мітохондріального геному NA та NB (GenBank: DQ490952.1 та AY506529.1).

6. ПРОВЕДЕННЯ ПЛР IN SILICO ЗА ДОПОМОГОЮ КОМП'ЮТЕРНОЇ ПРОГРАМИ SNAPGENE 5.0.5

ПЛР *in silico* або віртуальна ПЛР – математичний метод комп'ютерного аналізу теоретичної полімеразної ланцюгової реакції з використанням великого набору нуклеотидних послідовностей праймерів для прогнозування потенційної можливості ампліфікації ДНК досліджуваного генома, гена або будь-якої іншої ділянки ДНК. Цей інструмент використовують для оптимізації підбору праймерів або проб до ДНК мішені. Праймери аналізують на наявність ділянок зв'язування і їх ступінь комплементарності до ДНК мішені [24].

Проведення ПЛР *in silico* мітохондріального геному цитотипу NA з ДНК маркерами до S-типу стерильності

1. Запускають програму SnapGene 5.0.5 (тестова версія). У стартовому вікні для створення нового файлу вибирають команду «New DNA File». У вікні, що відкрилось, в поле «Create following sequence» вводять нуклеотидну послідовність, яку планується дослідити. Обирають топологію «Linear» та задають ім'я файлу (рис. 3).

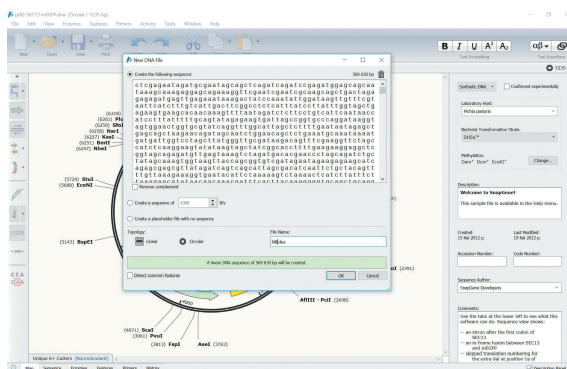


Рис. 3. Робоче вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія)

2. Програма SnapGene 5.0.5 (тестова версія) дозволяє також імпортувати нуклеотидні послідовності з інших ресурсів, наприклад з бази даних NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для цього в стартовому вікні обирають опцію «Import» та джерело імпорту даних (рис. 4).

3. У наступному вікні пропонують різні способи відображення досліджуваної послідовності: кількість білок-кодуючих локусів (Unique 6+Cutters2 – рис. 5 а; 6+Cutters196 – рис. 5 б), панель інструментів та варіанти проведення аналізу ДНК.



Рис. 4. Стартове вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія) та меню імпорту нуклеотидних послідовностей

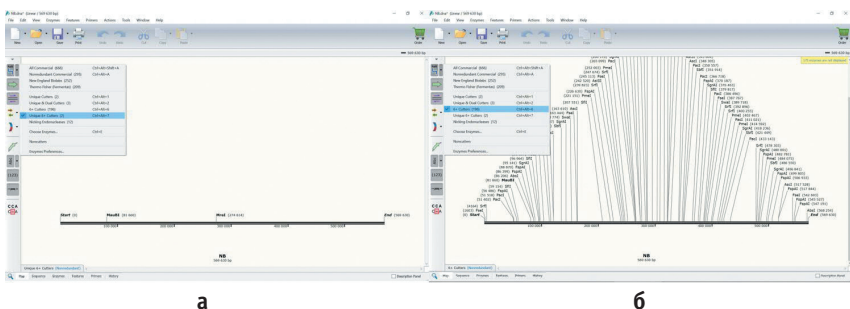


Рис. 5. Робоче вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія) – відображення досліджуваної нуклеотидної послідовності

4. Для проведення ПЛР на панелі інструментів обирають вкладку «**Actions**», у меню, що випадає, обирають «**PCR**» (рис. 6).

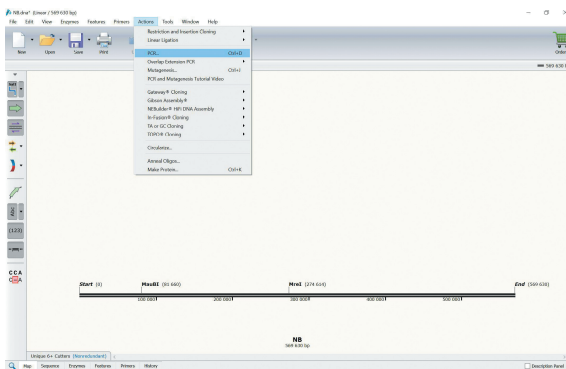


Рис. 6. Робоче вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія) – меню «Actions»

5. У наступному вікні вводять параметри ПЛР: в нижній частині вікна вводять послідовності праймерів та їхню назву. У вкладці «**Primers**» обирають «**Hybridization Parameters for...**» (рис. 7 а) і вказують найнижче можливе значення температури гібридизації праймерів та кількість нуклеотидів на 3'-кінцях послідовностей праймерів, які комплементарні нуклеотидам досліджуваної послідовності (рис. 7 б).

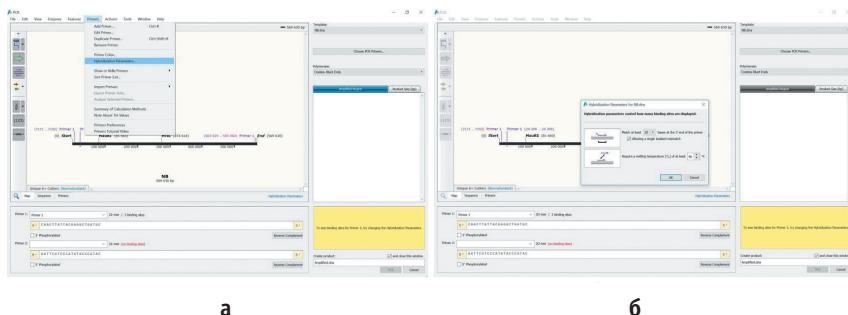


Рис. 7. Робоче вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія) – введення параметрів ПЛР

6. Результатом аналізу є ділянки гібридизації праймерів на досліджуваній послідовності у вигляді мапи (рис. 8 а), нуклеотидної послідовності (рис. 8 б) або списку праймерів. У правій нижній частині вікна відображено розмір очікуваного амплікону.

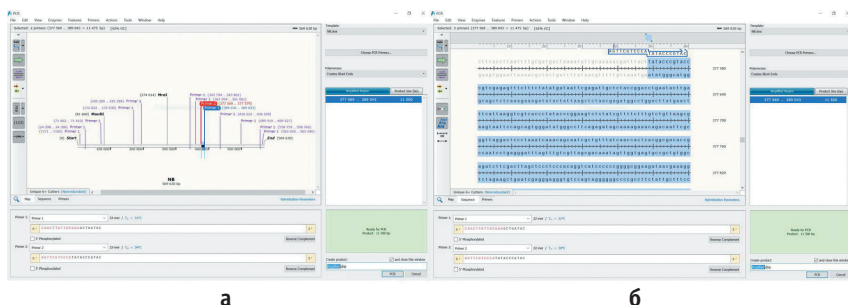


Рис. 8. Робоче вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія) – відображення ділянок гібридизації праймерів

7. Для проведення ПЛР in silico натискають кнопку «**PCR**». Результати ПЛР можна відобразити у вигляді мапи та нуклеотидної послідовності (рис. 9 а) ампліфікованого фрагменту (рис. 9 б).

8. Програма SnapGene 5.0.5 (тестова версія) дозволяє провести віртуальний електрофорез в агарозному гелі отриманих продук-

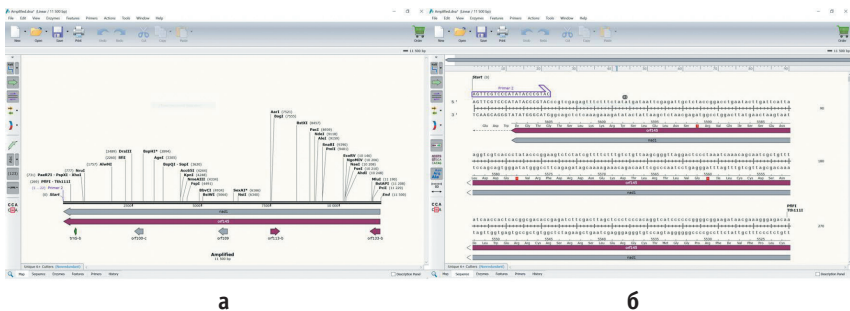


Рис. 9. Робоче вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія) – результати ПЛР *in silico*

тів ампліфікації. Для цього на вкладці «Tools» із списку, що випадає, обирають «Simulate Agarose Gel» (рис. 10).

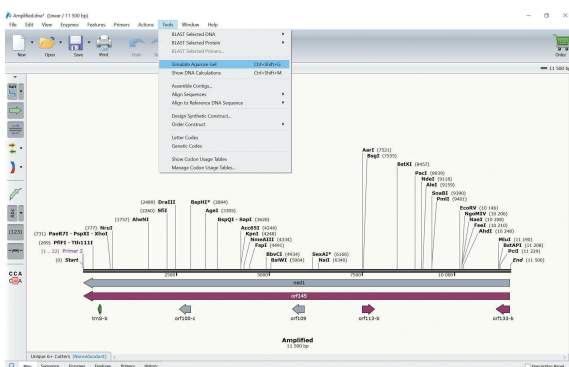


Рис. 10. Робоче вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія) – електрофорез в агарозному гелі

9. У результаті отримують електрофореграму з відображеними продуктами ампліфікації. Тип маркеру молекулярної ваги ДНК можна змінити відповідно до отриманих ампліконів шляхом натискання на трек «MW». У вікні, що відкриється доступний список маркерів молекулярної ваги ДНК з різним набором маркерних фрагментів ДНК (рис. 11).

10. Для збереження результатів ПЛР *in silico* користуються меню «File» та обирають потрібний спосіб збереження. У контекстному меню в полі мапи з результатами аналізу доступна функція копіювання та редагування зображення.

Таким чином, за допомогою ПЛР *in silico* в результаті досліджень двох цитотипів мітохондріального геному кукурудзи за праймерами до S- та С-типів стерильності виявлено від 2 до 12

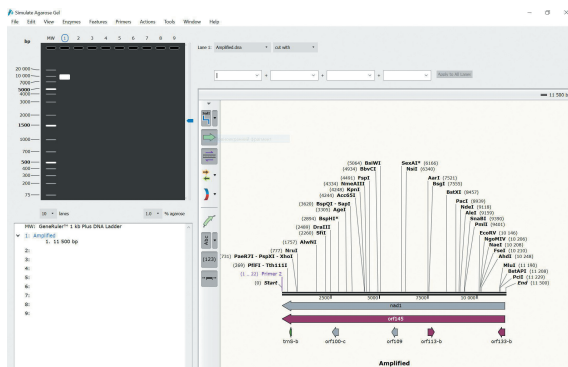


Рис. 11. Робоче вікно програми SnapGene 5.0.5 (тестова версія) – результати електрофорезу в агарозному гелі; MW – GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

сайтів зв'язування та тільки один неспецифічний продукт ампліфікації розміром менше 50 тисяч пар нуклеотидів. Отже, наявність продуктів ампліфікації будь-якого розміру відмінного від продуктів, які вказують на тип стерильності, є неінформативним. Єдиним підтвердженням стерильності лінії кукурудзи за S- та C-типам є наявність специфічних ампліконів розмірами 799 та 398 пн.

Висновки

1. Використання та впровадження розробленої методики забезпечить швидкий та надійний підхід для ідентифікації стерильних ліній кукурудзи S- та C-типів стерильності в комплексі із польовими дослідженнями, які мають ряд обмежень (температури, вологості, строків сіви, тривалості світлового дня).

2. За умови державної реєстрації ліній кукурудзи розроблений підхід підвищить якість експертизи на ВОС та скоротить термін польової експертизи до 1 року їхніх стерильних ліній-аналогів.

3. Розроблені методичні рекомендації забезпечать можливість швидко визначити відмінність між лініями, які є морфологічно ідентичними та відрізняються лише типом цитоплазми.

Список використаних літературних джерел

1. Абрамова З. И. Исследование белков и нуклеиновых кислот: Учебное пособие. Казань, 2006. 162 с.
2. Анисимова И. Н., Гаврилова В. А. Структурно-функциональное разнообразие генов, супрессирующих фенотип цитоплазматической мужской стерильности у растений. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2012. Т. 170. С. 3–16.
3. Аукунов Н. Е., Масабаева М. Р., Хасанова У. У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе. *Наука и здравоохранение*. 2015. № 1. С. 51–53.
4. Великов В. А. (2013). Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов: Саратовский источник, 2013. 84 с.
5. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. М.: Мир, 1991. 408 с.
6. Гонтаровский В. А. Генетическая классификация источников цитоплазматической мужской стерильности у кукурузы. *Генетика*. 1971. № 9. С. 22–30.
7. Коновалов Ю. Б., Долгодворова Л. И., Степанова Л. В. и др. (1990). Частная селекция полевых культур. М.: Агропромиздат, 1990. 542 с.
8. Кривошеев Г. Я., Игнатьев А. С. Восстановительная и закрепительная способность линий кукурузы в стерильной цитоплазме «М» и «С» типов ЦМС. *Зерновое хозяйство России*. 2019. № 2. С. 38–41. <https://doi:10.31367/2079-8725-2019-62-2-38-41>
9. Кривошеев Г. Я. Классификация линий кукурузы по составу аллелей генов восстановителей фертильности «С» типа стерильности. *Зерновое хозяйство России*. 2018. № 1. С. 81–88.
10. Методика проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні. Методи визначення показників якості продукції рослинництва / за ред. С. О. Ткачик. Вінниця: Нілан-ЛТД, 2015. 160 с.
11. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості: ДСТУ 4138-2002 [Чинний від 2004-01-01]. К.: Держспоживстандарт України, 2003. 173 с. (Держспоживстандарт України).
12. Палилова А. Н., Орлов П. А., Волуевич Е. А. Фундаментальные и прикладные проблемы взаимодействия ядерной и цитоплазматических генетических систем у растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2005. Т. 9. № 4. С. 499–504.
13. Присяжнюк Л. М., Ткачик С. О., Шитікова Ю. В. та ін. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських культур за допомогою SSR маркерів. Вінниця, 2019. 23 с.
14. 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.
15. Сліщук Г. І., Кожухова Н. Е., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетичний аналіз регіонів мітохондріону, асоційованих з цитоплазматичною чоловічою стерильністю, у кукурудзи. *Цитология и генетика*. 2011. № 3. С. 15–19.
16. Чеканова О. Ю. Реакція ліній кукурудзи з еректоїдним розміщенням листків на ЦЧС М і С-типів. Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. Умань, 2013. Вип. 83. С. 122–127.
17. Allen J. O., Fauron C. M., Minx P. et al. Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize. *Genetics*. 2007. Vol. 177, No. 2. P. 1173–1192. <https://doi:10.1534/genetics.107.073312>
18. Beckett J. B. Classification of Male-Sterile Cytoplasms in Maize (*Zea mays* L.) 1. *Crop Science*. 1971. Vol. 11, No. 5. P. 724–727. <https://doi:10.2135/cropsci1971.0011183X001100050037x>

19. Clifton S. W., Minx P., Fauron C. M. R. et al. Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant physiology*. 2004. Vol. 136, No. 3. P. 3486–3503. <https://doi:10.1104/pp.104.044602>
20. Darracq A., Varre J. S., Touzet P. A scenario of mitochondrial genome evolution in maize based on rearrangement events. *BMC genomics*. 2010. Vol. 11, No. 1. P. 233. <https://doi:10.1186/1471-2164-11-233>
21. Dewey R. E., Timothy D. H., Levings C. Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. *Current genetics*. 1991. Vol. 20, No. 6. P. 475–482. <https://doi:10.1007/BF00334775>
22. DuVick D. N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. In *Advances in genetics*. 1965. Vol. 13. P. 1–56. [https://doi:10.1016/S0065-2660\(08\)60046-2](https://doi:10.1016/S0065-2660(08)60046-2)
23. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol*. 2019. Vol. 36. No. 2. P. 116–117. https://doi:10.4103/JOC.JOC_110_18
24. Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y. et al. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*. 2017. Vol. 109, No. 3-4. P. 312–319. <https://doi:10.1016/j.ygeno.2017.05.005>
25. Laughnan J. R., Gabay-Laughnan S. Cytoplasmic male sterility in maize. *Annual review of genetics*. 1983. Vol. 17. No. 1. P. 27–48. <https://doi:10.1146/annurev.ge.17.120183.000331>
26. Levings C. S., Sederoff R. R. Nucleotide sequence of the S-2 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1983. Vol. 80. No. 13. P. 4055–4059. <https://doi:10.1073/pnas.80.13.4055>
27. Liu Z., Peter S. O., Long M. et al. A PCR assay for rapid discrimination of sterile cytoplasm types in maize. *Crop science*. 2002. Vol. 42. No. 2. P. 566–569.
28. Manson J. C., Liddell A. D., Leaver C. J., Murray K. A protein specific to mitochondria from S-type male-sterile cytoplasm of maize is encoded by an episomal DNA. *The EMBO journal*. 1986. Vol. 5. No. 11. P. 2775–2780.
29. Stevanovic M., Camdzija Z., Pavlov J. et al. The application of protein markers in conversion of maize inbred lines to the cytoplasmic male sterility basis. *Genetika*. 2016. Vol. 48. No. 2. P. 691–698. <https://doi:10.2298/GENSR1602691S>
30. Vancetovic J., Ignjatovic-Micic D., Nikolic A. et al. (2013). Potentially a new subtype of the cytoplasmic male sterility S-type in maize. *Genetika*. Vol. 45. No. 1. P. 145–151. <https://doi:10.2298/GENSR1301145V>

**Застосування ДНК маркерів для визначення S- та C-типів стерильності
кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) в кваліфікаційній експертизі
на відмінність, однорідність та стабільність**

Науково-методичні рекомендації

Методичні рекомендації розглянуто, схвалено та рекомендовано до видання
Вченою радою Українського інституту експертизи сортів рослин,
протокол № 10 від «18» грудня 2019 року.

Методичні рекомендації підготували: Л. М. Присяжнюк, С. М. Гринів,
Ю. В. Шитікова, С. О. Черній, М. М. Таганцова, О. В. Свиначук, С. І. Мельник,
С. О. Ткачик, З. Б. Києнко, Український інститут експертизи сортів рослин.

Комп'ютерне верстання: Бойко А. І.

Формат 64×84/16. Папір крейдований.
Друк цифровий. Гарнітура SchoolBook
Ум. друк. арк. Обл.-вид. арк.
Наклад 20 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, а/с 8825, м. Вінниця, вул. Келецька, 51а.
Тел.: (432) 603-000, (096) 97-30-934, (093) 89-13-852.
e-mail: tvoru@tvoru.com.ua
<http://www.tvoru.com.ua>