



Міністерство аграрної політики
та продовольства України



Український інститут
експертизи сортів рослин

МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ОЦІНКИ СОРТІВ РОСЛИН НА ВОС ТА СОРТОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ

Методичні рекомендації

м. Вінниця
«ТВОРИ»
2023

Міністерство аграрної політики та продовольства України
Український інститут експертизи сортів рослин

**МЕТОДИ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ
ДЛЯ ОЦІНКИ СОРТІВ РОСЛИН
НА ВОС ТА СОРТОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ**

Методичні рекомендації

м. Вінниця
«ТВОРИ»
2023

УДК 577.213.32: 577.112:57.087.1

М 54

М 54 Методи молекулярно-генетичного аналізу для оцінки сортів рослин на ВОС та сортової ідентифікації :
методичні рекомендації / Присяжнюк Л. М., Гринів С. М., Мельник С. І., Шитікова Ю. В., Діхтяр І. О.,
Таганцова М. М.; Український інститут експертизи сортів рослин. Вінниця : «ТВОРИ», 2023. 40 с.
ISBN 978-617-552-337-7

Розглянуто, схвалено та рекомендовано до друку Вченою радою Українського інституту експертизи сортів рослин
(протокол № 6 від 30 березня 2023 р.)

Рецензенти: Кляченко О. Л., доктор с.-г. наук, професор, Національний університет біоресурсів
і природокористування України
Карпук Л. М., доктор с.-г. наук, професор, Білоцерківський національний аграрний університет

Методи молекулярно-генетичного аналізу для оцінки сортів рослин на ВОС та сортової ідентифікації: методичні
рекомендації розроблено в Українському інституті експертизи сортів рослин за сприяння закладів експертизи Коро-
лівства Нідерландів, Великої Британії та Міжнародної організації з тестування насіння (ISTA). Збірник призначено для
спеціалістів із проведення кваліфікаційної (технічної) експертизи сортів рослин, селекціонерів і фахівців наукових
установ.

УДК 577.213.32: 577.112:57.087.1

© Присяжнюк Л. М., Гринів С. М., Мельник С. І.,
Шитікова Ю. В., Діхтяр І. О., Таганцова М. М., 2023
© Український інститут експертизи сортів рослин, 2023

ЗМІСТ

Вступ	4
Методично-правові засади застосування біохімічних і молекулярних методів експертизи сортів рослин	4
Досвід країн-членів UPOV у застосуванні біохімічних і молекулярних маркерів в експертизі на ВОС	6
Частина 1. Методики електрофорезу запасних білків насіння	9
Методика електрофорезу гордеїнів ячменю (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	
Методика електрофорезу геліантинів соняшнику (<i>Helianthus annuus</i> L.)	9
Методика електрофорезу зеїнів кукурудзи (<i>Zea mays</i> L.)	11
Методика електрофорезу проламінів злаків: пшениці (<i>Triticum</i> L.) (гліадини), жита (<i>Secale cereale</i> L.) (секаліни), вівса (<i>Avena</i> L.) (авеніни) та тритикале (<i>Triticosecale</i> Witt.) (гліадини)	13
Інтерпретація результатів електрофорезу запасних білків	14
Частина 2. Методики дослідження з молекулярно-генетичного маркування та паспортизації рослин	17
Екстракція ДНК з рослинного матеріалу (рідинно-фазний метод)*	17
Екстракція ДНК з рослинного матеріалу (твердофазний метод)*	18
SSR та EST-SSR аналіз сортів рослин	20
SSR аналіз ліній і гібридів кукурудзи звичайної (<i>Zea mays</i> L.)	20
SSR аналіз гібридів і сортів пшениці (<i>Triticum</i> L.)	21
SSR аналіз гібридів і сортів ячменю (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	21
SSR аналіз ліній і гібридів соняшнику однорічного (<i>Helianthus annuus</i> L.)	22
SSR аналіз ліній, гібридів і сортів ріпаку (<i>Brassica napus</i> L. <i>oleifera</i>) озимого та ярого типів розвитку	23
SSR аналіз сортів сої культурної (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	24
SSR аналіз сортів картоплі (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	24
EST-SSR аналіз сортів часнику (<i>Allium sativum</i> L.)	25
EST-SSR аналіз сортів салату посівного (<i>Lactuca sativa</i> L.) та всіх його типів	26
Розділення та візуалізація продуктів ПЛР – капілярний електрофорез продуктів ПЛР	26
Розділення та візуалізація продуктів ПЛР – електрофорез продуктів ПЛР в агарозному гелі	28
KASP™ аналіз ліній кукурудзи	29
Інтерпретація результатів SSR та EST-SSR аналізу сортів рослин	30
Інтерпретація результатів KASP™ аналізу ліній кукурудзи	31
Список використаних літературних джерел	32

Вступ

Методично-правові засади застосування біохімічних і молекулярних методів експертизи сортів рослин

З моменту приєднання до Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин (UPOV – The International Union for the Protection of New Varieties of Plants) та ратифікації Міжнародної конвенції з охорони нових сортів рослин Україна взяла на себе зобов'язання щодо охорони прав на сорти всіх родів і видів. Невід'ємною частиною визначення придатності сорту для набуття права на нього як на об'єкт інтелектуальної власності є проведення комплексу досліджень з експертизи сортів рослин із визначення відмінності, однорідності та стабільності сорту (далі – ВОС).

Експертиза на ВОС ґрунтується, головним чином, на дослідженнях у період вегетації рослин та передбачає морфологічний опис за ідентифікаційними ознаками, які залежать від виду рослин. У результаті вивчення сорту-кандидата складають опис із використанням ідентифікаційних морфологічних ознак, за якими він може бути визначений як сорт. Враховуючи стрімкий розвиток селекції, створено велику кількість сортів, які стає все важче ідентифікувати. Тому на початку 2000-х років низкою країн-членів UPOV започатковано застосування додаткових методів оцінки сортів, зокрема біохімічних і молекулярних. Деякі досліджені та адаптовані моделі застосування біохімічних і молекулярних методів увійшли до Методики проведення експертизи на ВОС відповідних ботанічних таксонів та до Керівництва із використання біохімічних і молекулярних маркерів в експертизі на ВОС – TGP/15 Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS).

Залучення додаткових методів аналізу сортів рослин у процесі кваліфікаційної експертизи передбачено як міжнародним законодавством, так і нормативно-правовими актами України. Статтею 27 Закону України «Про охорону прав на сорти рослин» визначено, що під час проведення кваліфікаційної експертизи Компетентний орган або експертний заклад має право на-

правити заявнику запит про надання додаткових матеріалів, інформації, документів і зразків, необхідних для встановлення новизни, відмінності, однорідності та стабільності сорту.

Відповідно до статті 12 Міжнародної конвенції з охорони нових сортів рослин, здійснюючи науково-технічну експертизу, орган з експертизи може вирощувати сорт або проводити інші необхідні випробування, поставити вимогу виростити сорт чи здійснити інші необхідні випробування або врахувати результати вже проведених випробувань. Для цілей такої експертизи орган може вимагати від селекціонера надання будь-якої необхідної інформації, документів або матеріалів.

З метою реалізації вимог Міжнародної конвенції з охорони нових сортів рослин UPOV розроблено керівництва та документи рекомендаційного характеру щодо застосування біохімічних і молекулярних методів в експертизі на ВОС. Зокрема, документ серії TG (Test Guidelines) – TG/1/3 «General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized descriptions of new varieties of plants» містить окремий пункт щодо можливості застосування нових типів характеристик, отриманих за допомогою біохімічних і молекулярних методів. В інформаційному документі UPOV/INF/18 Possible Use of Molecular Markers in the Examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) розглянуто моделі та приклади застосування молекулярних маркерів в експертизі на ВОС. У результаті розгляду пропозицій від країн-членів UPOV щодо застосування молекулярних маркерів, експертами робочої групи UPOV із біохімічних та молекулярних технік, технічним комітетом UPOV, а також спеціалістами адміністративно-правового комітету запропоновано базові моделі застосування молекулярних маркерів в експертизі на ВОС.

Моделі з позитивною оцінкою містять застосування маркерів до господарсько-цінних ознак (Модель 1), поєднання фенотипо-

вих і молекулярних дистанцій в управлінні колекціями загальновідомих сортів (Модель 2), застосування каліброваних молекулярних дистанцій в управлінні колекціями загальновідомих сортів (Модель 3). Модель без позитивної оцінки передбачає застосування характеристик, одержаних за допомогою молекулярних маркерів, та включає оцінку нових сортів за набором маркерів для визначення відмінності й однорідності сорту.

Документ серії TGP (Test Guidelines Programme) – TGP/15 Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS) містить керівництво із застосування біохімічних і молекулярних маркерів під час експертизи на ВОС на основі схвалених UPOV моделей і приклади їх використання країнами-членами UPOV. Відповідно до викладеної концепції Модель 1 передбачає визначення таких господарсько-цінних характеристик сортів, як стійкість до хвороб, застосовуючи ДНК-маркери, що дає змогу уникнути проведення випробувань у польових умовах, які можуть потребувати організації відповідних відокремлених ділянок, отримання спеціальних дозволів на проведення такої діяльності тощо.

Основною особливістю Моделі 2 є визначення сортів із колекції загальновідомих, що за фенотиповими та молекулярними дистанціями є достатньо відмінними від сортів, які випробовують з метою їх виключення з польових випробувань. Рішення приймають на основі порогового значення, яке отримують експериментально, розраховуючи дистанції (фенотипові та молекулярні) між загальновідомими сортами. Такі розрахунки вимагають проведення попередньої роботи з оцінки загальновідомих сортів за вибраним типом біохімічних і молекулярних маркерів.

Модель 3 передбачає визначення тісної кореляції між біохімічними або молекулярними маркерами та фенотиповими ознаками. За такої умови порогове значення відмінності, визначене за біохімічними чи молекулярними маркерами, можна екстраполювати на порогове значення, яке можливо отримати за фенотиповими дистанціями. Особливістю виключення з польових випробувань достатньо відмінних сортів із колекції загальновідомих є те, що порогове значення для прийняття рішення про виключення можна встановити з прийнятним рівнем надійності. Це свідчить про те, що достатньо відмінні сорти, залишені для проведення польових випробувань, будуть визначені у процесі росту та розвитку рослин.

Застосування Моделі 4 базується на використанні певного набору біохімічних або молекулярних маркерів (наприклад, SSR-маркерів). Оцінку сортів, які проходять експертизу ВОС за молекулярними маркерами, здійснюють перед випробуванням у польових умовах. За умови встановлення відмінності й однорідності сорту за біохімічними або молекулярними маркерами від загальновідомих сортів, сорт вважають відмінним та однорідним. Якщо за вибраним набором маркерів не виявлено відмінності, то сорти, які виявилися подібними за цими маркерами, включають у польове випробування. Слід зазначити, що рішення про відмінність приймають з огляду на обраний тип маркерів і кількість відмінних алелів або поліпептидів, а також зважаючи на вже отримані дані за сортами певного виду рослин, наявні у відповідній базі даних. Надалі генетичні профілі чи інші характеристики сорту, отримані за допомогою біохімічних і молекулярних маркерів при застосуванні Моделі 4, вносять до бази даних та використовують для порівняння з сортами-кандидатами, які проходять експертизу на ВОС.

Отже, основною метою застосування біохімічних і молекулярних маркерів у експертизі на ВОС є визначення відмінності й однорідності сортів і скорочення кількості сортів із колекції загальновідомих для польових випробувань.

Крім того, застосування біохімічних і молекулярних методів не обмежується лише кваліфікаційною експертизою на ВОС у системі охорони прав на сорти рослин, такі методи також використовують при сортовому контролі у процесі ведення насінництва. Так, Схемами ОЕСР (Організації економічного співробітництва та розвитку) сортової сертифікації або контролю насіння, призначеного для міжнародної торгівлі (Схеми), метою яких є заохочення до використання насіння незмінно високої якості країнами-учасницями, передбачено постконтрольне тестування насіння задля визначення того, що характер сортів залишився без змін у процесі розмноження, а також забезпечення перевірки ідентифікації сорту та чистоти окремих партій насіння. Ідентифікація сорту визначається офіційним описом його характеристик, похідних від відповідного генотипу або комбінації генотипів. Сортова чистота – співвідношення рослин чи насіння в межах популяції, що відповідає офіційному описові сорту. Отже, постконтрольне тестування передбачає висівання проб відповідного ботанічного таксона та

опис ознак сорту, визначених в офіційному описі, що також знаходить відображення в українському законодавстві (Закон України «Про насіння і садивний матеріал» та Порядок проведення сертифікації, видачі та скасування сертифікатів на насіння та/або садивний матеріал та форм сертифікатів на насіння та/або садивний матеріал, затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 27.02.2017 р. №97).

Водночас Схемами передбачено проведення інших необхідних тестувань відповідного сорту та одержання будь-якої інформації на підтримку позитивного рішення щодо сертифікації кожної партії насіння, зокрема використання визнаних на міжнародному рівні біохімічних і молекулярних методів ідентифікації. Такі методи переважно застосовують, якщо після оцінювання сорту в польових умовах залишилися сумніви щодо сортової ідентичності партій насіння. У керівництві з проведення польового оцінювання (Guidelines for control plot tests and field inspection of

seed crops) визначено базові біохімічні та молекулярні методи, які включають методи електрофорезу білків та ізоферментів та аналіз ДНК сортів рослин.

Відповідно до цього Методикою проведення ділянкового (грунтового) сортового контролю та лабораторного сортового контролю, що в установленому законодавством порядку затверджується уповноваженим органом управління, визначено, що для встановлення ідентичності сорту та сортової чистоти застосовують визнані на міжнародному рівні біохімічні і молекулярні методи ідентифікації, а саме: електрофорез запасних білків і ферментів та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) із використанням ДНК-маркерів.

Отже, правові підстави використання біохімічних і молекулярних методів аналізу для цілей експертизи сортів рослин та подальшого контролю за збереженням сортових якостей визначено як на міжнародному законодавчому рівні, так і на рівні нормативно-правових актів України.

Досвід країн-членів UPOV у застосуванні біохімічних і молекулярних маркерів в експертизі на ВОС

Враховуючи вимоги Міжнародної конвенції з охорони нових сортів рослин, країнами Європейського союзу прийнято Регламент Ради (ЄС) № 2100/94 від 27 липня 1994 року про права на сорти рослин Співтовариства. Статтею 56 цього Регламенту визначено, що установи з експертизи повинні для цілей технічної експертизи вирощувати сорт або проводити будь-які інші необхідні дослідження з метою встановлення ВОС. Як уже зазначалося, країни-члени Європейського союзу (ЄС) вже приблизно 20 років застосовують біохімічні та молекулярні методи аналізу для цілей експертизи сортів рослин на ВОС. Зокрема, експертний орган Франції використовує аналіз ліній кукурудзи на основі SNP маркерів у поєднанні з морфологічним описом для організації колекцій загальновідомих сортів. Також експертні органи Франції та Німеччини ведуть розробки SNP маркерів для експертизи на ВОС сортів ріпаку. Експертний орган Нідерландів застосовує SSR маркери для оцінки генетичного різноманіття картоплі, квасолі, квітково-декоративних рослин. Також широко застосовується ДНК-маркування господарсько-цінних ознак сільськогосподарських і квітково-декоративних культур,

зокрема стійкості до хвороб, підвищеного вмісту амінокислот чи стану вуглеводно-амілазного комплексу тощо.

Однак відповідно до опитування щодо використання біохімічних і молекулярних маркерів, яке проводить UPOV, перелік країн-членів UPOV, що застосовують біохімічні та молекулярні маркери на постійній основі або в разі потреби в експертизі на ВОС, не обмежується країнами ЄС. Широке застосування біохімічних і молекулярних маркерів спостерігають у Великій Британії, Японії та Китаї.

Щодо ботанічних таксонів, методи оцінки яких включено у цей збірник, відповідно до опитування UPOV у 2021 році для групи зернових широко використовують аналіз сортів як за біохімічними, так і за ДНК-маркерами (таблиця 1).

Так, для аналізу ліній і гібридів кукурудзи використовують методи SDS-PAGE електрофорезу, SNP та SSR маркерів; сорти ячменю та пшениці оцінюють за SSR аналізом і SDS-PAGE електрофорезом. Соняшник однорічний і ріпак аналізують, застосовуючи SSR та SNP аналіз. Види рослин овочевого напрямку використання, такі як картопля та салат, оцінюють як за ДНК-маркерами

Таблиця 1*. Досвід країн-членів UPOV у застосуванні біохімічних і молекулярних маркерів

Назва виду рослини	Метод	Мета	Країна	Частота використання для цілей експертизи
Картопля	SSR аналіз / PAGE електрофорез	Визначення ідентичності / визначення відмінності на основі поєднання фенотипових і молекулярних дистанцій	Нідерланди / Чехія / Німеччина / Японія / Велика Британія / Естонія / Словаччина	Постійно / за необхідності
Кукурудза	SSR аналіз / SNP аналіз / SDS-PAGE електрофорез	Визначення сортової чистоти / визначення ступеня гібридності / визначення ідентичності / визначення відмінності на основі поєднання фенотипових і молекулярних дистанцій	Франція / Чехія / Японія / Йорданія	Постійно / за необхідності
Овес	SDS-PAGE електрофорез	Визначення ідентичності	Чехія	Постійно
Пшениця тверда	SSR аналіз	Визначення сортової чистоти	Йорданія	За необхідності
Пшениця м'яка	SSR аналіз / SDS-PAGE електрофорез	Визначення сортової чистоти / визначення ступеня гібридності / визначення ідентичності / визначення відмінності на основі поєднання фенотипових і молекулярних дистанцій	Франція / Китай / Чехія	Постійно / за необхідності
Ріпак	SSR аналіз / SNP аналіз	Визначення сортової чистоти / визначення ступеня гібридності / визначення ідентичності / визначення відмінності на основі поєднання фенотипових і молекулярних дистанцій	Франція / Велика Британія	Постійно / за необхідності
Салат посівний	Taqman аналіз	Ідентифікація господарсько-цінних ознак	Нідерланди	Постійно
Соняшник однорічний	SSR аналіз	Визначення сортової чистоти / визначення ступеня гібридності / визначення ідентичності	Франція / Японія	Постійно / за необхідності
Соя культурна	SSR аналіз	Визначення відмінності на основі поєднання фенотипових і молекулярних дистанцій	Китай / Бразилія	Постійно
Тритикале	SSR аналіз / SDS-PAGE електрофорез	Визначення ступеня гібридності / визначення ідентичності	Франція / Чехія	Постійно
Ячмінь	SSR аналіз / SDS-PAGE електрофорез	Визначення сортової чистоти / визначення відмінності на основі поєднання фенотипових і молекулярних дистанцій / визначення ідентичності	Китай / Чехія / Франція / Йорданія	Постійно / за необхідності

*Примітка: складено на основі опитування, проведеного UPOV у 2021 р.

(Taqman аналіз, SSR маркери), так і за SDS-PAGE електрофорезом.

Відповідно до наданих результатів опитування, у разі використання біохімічних і молекулярних методів для визначення відмінності на основі поєднання молекулярних і фенотипових дистанцій (Модель 2) експертні органи країн-членів UPOV застосовують певний аналіз постійно для всіх сортів, які проходять кваліфікаційну експертизу на ВОС. Зазвичай такі дослідження проводять протягом першого року експертизи, а випробувані сорти порівнюють між собою та із сортами робочої колекції загальновідомих сортів. На основі оцінки фенотипових і молекулярних дистанцій та з огляду на

розраховане порогове значення відмінності роблять висновок про відмінність сортів і необхідність їх подальшого випробування в польових умовах. Біохімічні та молекулярні методи як додатковий вид експертизи також можуть використовуватись у рамках кваліфікаційної експертизи на ВОС у разі виникнення спірних питань щодо встановлення однорідності та відмінності, оцінки гібридів за їх батьківськими компонентами або підтвердження ідентичності певних зразків.

Відповідно до статті 23 Закону України «Про охорону прав на сорти рослин» результати експертизи сорту є конфіденційною інформацією, що зберігається Компе-

тентним органом або експертним закладом в таємниці. Доступ третіх осіб до результатів експертизи в період її проведення заборонено, за винятком випадків, якщо цей доступ передбачено законодавством. Отже, під час використання біохімічних і молекулярних методів у рамках кваліфікаційної експертизи на ВОС отримані дані (генетичні профілі сортів) є конфіденційними та застосовуються виключно для цілей експертизи.

Очевидно, що застосування маркерів до господарсько-цінних ознак (Модель 1) має вагомому перевагу перед оцінкою сортів в полі, зважаючи на труднощі інокулювання рослин у польових умовах, проте ця модель також не виключає штучне інокулювання в контрольованих умовах (наприклад, у фітопатологічній лабораторії). Водночас попри труднощі та виклики при застосуванні інших моделей, наприклад необхідність розробки або використання достатньої кількості біохімічних чи молекулярних маркерів і фенотипових характеристик із мінімальною реакцією на фактори навколишнього середовища, підготовча робота з визначення значущості певних характеристик і порогових значень фенотипових або молекулярних дистанцій, низька ефективність застосування на сортах-синтетиках чи сортах-популяціях, а також можливість додаткових витрат для селекціонерів і заявників, оскільки, порівнюючи з країнами ЄС, в Україні експертиза сорту в польових умовах є порівняно недороговартісним методом (для

вітчизняних селекціонерів законодавством передбачені пільги), застосування методів біохімічного та молекулярного аналізу для експертизи сортів рослин має численні переваги як для селекціонерів та заявників, так і для підвищення якості та швидкості експертизи. До переваг застосування біохімічних і молекулярних маркерів належать:

- покращення організації управління колекціями загальновідомих сортів, які необхідно порівнювати у польових умовах;
- використання фенотипових і молекулярних дистанцій із пороговими значеннями, які оцінюють спеціалісти ВОС;
- можливість використання біохімічних і молекулярних ознак, прояв яких не залежить від факторів навколишнього середовища;
- скорочення терміну експертизи та кількості загальновідомих сортів для польових випробувань.

Отже, враховуючи вимоги національного та міжнародного законодавства, Статутом Українського інституту експертизи сортів рослин (УІЕСР) визначено його повноваження у здійсненні науково-технічної експертизи сортів рослин, а також проведенні ділянкового (грунтового) сортового контролю та лабораторного сортового контролю, що поряд із традиційними методами визначення відмінності, однорідності та стабільності сортів рослин може також включати додаткове проведення експертизи та ідентифікацію сортів методами біохімічного та молекулярного аналізу.

Частина 1.

Методики електрофорезу запасних білків насіння

Методика електрофорезу гордеїнів ячменю (*Hordeum vulgare* L.)

Гордеїнами називають спирторозчинну фракцію запасних білків насіння ячменю. Метод ґрунтується на електрофоретичному розділенні гордеїнів у поліакриламідному гелі (ПААГ) з буферною системою на основі мурашиної кислоти та додаванням денатуруючого агента невисокої концентрації.

1. Обладнання та матеріали:

камера для вертикального електрофорезу (розмір скляних пластин – 20×20 см); спейсерні та короткі скляні пластини (20×20 см); транслюмінатор видимого світла; система гель-документації; термостат із блоком для мікропробірок (температура до 100 °С); лункоутворювачі (гребінки): один на 28, другий на 29 лунок; джерело струму; магнітна мішалка з підігрівом; мікроцентрифужні пробірки – 0,5 мл; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; ступка Абіха; вортекс; центрифуга (прискорення не менше ніж 2000 g); шпатель та лотки для зважування реактивів; ваги аналітичні; мірні циліндри різних об'ємів; мірні стакани; спейсери товщиною 0,7 мм; пластиковий контейнер із кришкою для фарбування гелів; фільтрувальний папір; гумові рукавички.

2. Реактиви*:

- гістидин-НСІ;
- акриламід;
- N,N'-метиленбісакриламід;
- сечовина, карбамід;
- трихлороцтова кислота (ТХО) 100%;
- ТЕМЕД (Тетраметилендіамін);
- семиводний сульфат заліза ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$);
- амонію персульфат (ПСА), амоній надсірчаноокислий;

Bind-Silane (Methacryloxуpropyltrimethoxуsilane) A 100;

- аскорбінова кислота;
- крижана оцтова кислота;
- мурашина кислота;
- етиловий спирт (95–96%);
- піронін G;
- кумасі синій R-250.

* *Примітка:* ступінь очищення реактивів – «чда» або «хч»

3. Приготування розчинів

– екстракційний буфер (на 50 мл: сечовина – 16,516 г; піронін G – на кінчику скальпеля – до інтенсивного рожевого кольору). Зберігають за кімнатної температури у темній тарі без доступу світла до 6 місяців.

– робочий розчин Bind-Silane: Bind-Silane A 100 – 500 мкл; етиловий спирт (95–96%) – 100 мл; крижана оцтова кислота – 10 мл. Зберігають за температури 4 °С до 6 місяців.

– 4,44 М сечовина (на 1 л: розчиняють 266,666 г сечовини на магнітній мішалці з підігрівом). Зберігають за кімнатної температури до 6 місяців.

– розчин MSS (на 200 мл: акриламід – 60,08 г; N,N'-метиленбісакриламід – 3,2 г; розчин $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,044 г/100 мл H_2O) – 9,1 мл; аскорбінова кислота – 490 мг). Зберігають за температури 4 °С до 6 місяців.

– розчин SGB (на 50 мл: гістидин-НСІ – 1,2 г; крижана оцтова кислота – 1,6 мл). Зберігають за температури 4 °С до 6 місяців.

– розділюючий гель (на 100 мл: розчин MSS – 22 мл; 4,44 М сечовина – 67,5 мл; крижана оцтова кислота – 6 мл; дистильована вода – 4,5 мл). Використовують одразу для аналізу або зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– концентруючий гель (на 25 мл: розчин SGB – 4,25 мл; розчин MSS – 3,95 мл; 4,44 М сечовина – 16,8 мл). Використовують одразу для аналізу або зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– 10% -й розчин ПСА (на 10 мл: ПСА – 1 г). Використовують одразу або зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– електродний буфер для верхньої камери (+) (на 1 л: мурашина кислота – 1,66 мл). Використовують одразу для аналізу.

– електродний буфер для нижньої камери (–) (на 1 л: мурашина кислота – 3,33 мл). Використовують одразу для аналізу.

– розчин для фарбування та фіксації білків (на 1 л: кумасі R – 300 мг – розчиняють на магнітній мішалці з підігрівом; крижана оцтова кислота – 60 мл; ТХО 100% – 120 г).

4. Підготовка зразків та екстракція білка

1. Для визначення сортової чистоти використовують 57 насінин досліджуваного сорту, а для визначення ідентичності сорту – 50 насінин досліджуваного зразка сорту та 7 насінин контрольного сорту або декількох сортів.

2. Кожну насініну подрібнюють ступкою Абіха та поміщають в окрему пробірку об'ємом 0,5 мл. До подрібненого матеріалу додають по 320 мкл 70%-го розчину етилового спирту, перемішують на вортексі впродовж 10–20 с та інкубують протягом 2 год за температури 45 °С.

3. Після того, як білки перейшли у спирт, їх знову ретельно перемішують на вортексі та центрифугують за 2000 g протягом 5 хв.

4. Відбирають 90 мкл супернатанту в чисті пробірки й висушують у термостаті за температури 60 °С.

5. До висушеного осаду додають по 50 мкл екстракційного буферу й витримують мінімум 2 год за кімнатної температури.

5. Приготування гелю та проведення електрофорезу

1. Скляні пластини знежирюють 95–96%-м спиртом. Спейсерні пластини обробляють 50 мкл розчином Bind-Silane та підсушують протягом 20–30 хв за кімнатної температури.

2. Збирають касети для гелю (спейсерна + коротка) згідно з інструкцією до камери для електрофорезу.

3. Розділяючий гель використовують для формування пробки. До 30 мл гелю додають каталізатори полімеризації: 150 мкл 10%-го розчину ПСА та 15 мкл ТЕМЕД, обережно перемішують і заливають в зібрані касети шаром 7 мм. Полімеризація триває 5–10 хв.

4. Для заповнення однієї касети використовують 35 мл розділяючого гелю, до якого додають каталізатори: 150 мкл 10%-го розчину ПСА і 20 мкл ТЕМЕД, обережно перемішують. Заповнюють касету гелем, залишаючи 3–5 см від верхнього краю скляних пластин для концентруючого гелю.

5. Зверху на розділяючий гель нашаровують 500 мкл дистильованої води для вирівнювання гелю. Полімеризація триває 15 хв,

після чого за допомогою фільтрувального паперу позбуваються залишків вологи із внутрішніх поверхонь скляних пластин та з поверхні гелю.

6. Касети повністю заповнюють розчином концентруючого гелю. До 25 мл гелю додають 200 мкл 10%-го розчину ПСА та 20 мкл ТЕМЕД, обережно перемішують і заливають в гелеві касети. У заповнені касети відразу вставляють лункоутворювачі. Полімеризація триває 15 хв.

7. Гелеві касети поміщають у камеру для вертикального електрофорезу та закріплюють згідно з інструкцією до камери. Обережно виймають лункоутворювач, видаляють залишки вологи за допомогою фільтрувального паперу.

8. У лунки вносять по 20 мкл екстракту білків досліджуваних зразків. За допомогою мікропіпетки обережно нашаровують верхній електродний буфер у лунки.

9. У верхню та нижню камери наливають верхній і нижній електродні буфери відповідно, накривають запобіжною кришкою та під'єднують електроди до блоку живлення так, щоб верхній електрод виконував функцію катода, а нижній – анода.

10. Електрофорез проводять за таких параметрів: сила струму (I) – 15 мА протягом 15–20 хв (до виходу білків із лунок), I – 30 мА протягом 30 хв (переміщення білків у розділяючий гель), I – 90 мА – до закінчення електрофорезу. Інші параметри (V – напруга та W – потужність) виставляють на максимальні значення. Загальна тривалість електрофорезу – 5 год 15 хв.

11. Фарбування та фіксацію білків здійснюють одночасно. Для цього касети з гелем розбирають, а пластину з гелем опускають у пластиковий контейнер, який містить 1 л розчину фарби; закривають контейнер кришкою і залишають на 8 год.

12. Після фіксації та фарбування скляну пластину з гелем відмивають, замочуючи її у воді не менше ніж 3 год, підсушують за кімнатної температури, позначають контрольні сорти та фотографують за допомогою системи гель-документації і транслюмінатора видимого світла.

Методика електрофорезу геліантинів соняшнику (*Helianthus annuus* L.)

Геліантини – запасні білки насіння соняшнику, що контролюються мінімум шістьма локусами: HEL1, HEL2, HEL3, HEL4, HEL5, HEL6. Гени, що кодують синтез запасних білків, зібрані у кластери у вигляді одного компонента або єдиної групи (блоку). Блок електрофоретичних компонентів є фенотиповим маркером відповідного локусу на рівні білкових молекул. Метод ґрунтується на електрофоретичному розділенні геліантинів за допомогою електрофорезу в ПААГ з буферною системою гліцин-оцтова кислота.

1. Обладнання та матеріали:

камера для вертикального електрофорезу (розмір скляних пластин – 20×20 см); спейсерні та короткі скляні пластини (20×20 см); транслюмінатор видимого світла; система гель-документації; термостат із блоком для мікропробірок (температура до 100 °С); лункоутворювачі (гребінки) на 20 лунок; джерело струму; магнітна мішалка з підігрівом; мікроцентрифужні пробірки на 2 мл; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; ступка Абіха; вортекс; центрифуга (прискорення не менше ніж 4000 g); шпателі та лотки для зважування реактивів; ваги аналітичні; мірні циліндри різних об'ємів; мірні стакани; спейсери товщиною 0,7 мм; пластиковий контейнер із кришкою для фарбування гелів; фільтрувальний папір; гумові рукавички.

2. Реактиви*:

- акриламід;
- N,N'-метиленбісакриламід;
- сечовина, карбамід;
- н-Гексан, норм-Гексан $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$;
- трихлороцтова кислота (ТХО) 100%;
- ТЕМЕД (Тетраметилендіамін);
- семиводний сульфат заліза ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$);
- амонію персульфат (ПСА), амоній надсірчаноокислий;
- Bind-Silane (Methacryloxupropyltrimethoxysilane) A 100;
- аскорбінова кислота;
- крижана оцтова кислота;
- гліцин;
- етиловий спирт (95–96%);
- 2-меркаптоетанол;
- піронін G;
- кумасі синій R-250.

* *Примітка:* ступінь очищення реактивів – «чда» або «хч».

3. Приготування розчинів

– розчин для екстракції геліантинів (на 500 мл: сечовина – 150 г; 20% -й розчин етилового спирту – 150 мл; 2-меркаптоетанол – 5 мл; піронін G – на кінчику скальпеля – до інтенсивного рожевого кольору). Зберігають за кімнатної температури у темній тарі без доступу світла до 6 місяців.

– робочий розчин $A_{2,6}$ (на 600 мл: N,N'-метиленбісакриламід – 6,4 г; акриламід – 240 г). Зберігають за температури 4 °С до 6 місяців.

– 0,1% -й розчин $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (на 10 мл: 0,01 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Використовують одразу для аналізу.

– 3% -й розчин ПСА (на 10 мл: 0,3 г ПСА). Використовують одразу для аналізу.

– гель для електрофорезу (на 120 мл: гліцин – 0,12 г; крижана оцтова кислота – 2,4 мл; сечовина – 28,8 г (попередньо розчиняють на магнітній мішалці з підігрівом у 50-ти мл дистильованої води); розчин $A_{2,6}$ – 48 мл; ТЕМЕД – 0,36 мл; аскорбінова кислота – 0,12 г). Використовують одразу для аналізу або зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– електродний буфер (на 1,5 л: крижана оцтова кислота – 6,0 мл; гліцин – 0,6 г). Використовують одразу для аналізу.

– розчин для фарбування та фіксації білків (на 1 л: кумасі R – 300 мг – розчиняють на магнітній мішалці з підігрівом; крижана оцтова кислота – 60 мл; ТХО – 120 г).

4. Підготовка зразків та екстракція білка

1. Для визначення сортової чистоти використовують 40 насінин досліджуваного гібрида/лінії або батьківського компонента гібрида. З метою визначення ідентичності гібрида/лінії або батьківського компонента гібрида використовують 34 насінини досліджуваного зразка та 6 насінин контрольного зразка гібрида/лінії або батьківського компонента гібрида. У разі проведення аналізу з метою визначення ступеня гібридності використовують 28 насінин досліджуваного зразка гібрида та по 6 насінин обох батьківських компонентів.

2. Насіння звільняють від лушпиння та подрібнюють ступкою Абіха. Переносять у мікроцентрифужні пробірки об'ємом 2 мл та додають по 1 мл н-гексану. Перемішують упродовж 30–40 с на вортексі та інкубують протягом 30 хв за кімнатної температури. Після чого супернатант видаляють.

3. Очищення н-гексаном повторюють ще двічі. Після видалення н-гексану на остан-

ньому етапі осад підсушують під витяжною шафою протягом 1,5–2 год.

4. До знежиреного шроту додають 1 мл розчину для екстракції геліатинів, перемішують на вортексі впродовж 30–40 с та інкубують протягом 12–18 год за кімнатної температури.

5. Приготування гелю та проведення електрофорезу

1. Скляні пластини знежирюють 95–96% -м спиртом. Спейсерні пластини обробляють 50 мкл розчином Bind-Silane та підсушують протягом 20–30 хв за кімнатної температури.

2. Збирають касети для гелю (спейсерна + коротка) згідно з інструкцією до камери для електрофорезу.

3. Приготований гель використовують для формування пробки. До 20 мл гелю додають 300 мкл 0,1% -го розчину $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та 300 мкл 3% -го розчину ПСА, ретельно перемішують і заливають у зібрані касети шаром 7 мм. Полімеризація триває 10 хв.

4. Для заповнення однієї касети використовують 45 мл гелю, до якого додають 450 мкл 0,1% -го розчину $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та 450 мкл 3% -го розчину ПСА, ретельно перемішують. Заповнюють касету гелем та відразу вставляють лункоутворювачі. Полімеризація триває 15 хв.

5. Гелеві касети поміщають у камеру для вертикального електрофорезу та закріплюють згідно з інструкцією до камери. Обережно виймають лункоутворювач, видаля-

ють залишки вологи за допомогою фільтрувального паперу.

6. Перед внесенням у лунки гелю розчин білків інкубують протягом 5 хв за температури 95 °С, охолоджують та центрифугують за 4000 g упродовж 5 хв. У лунки вносять по 20 мл екстракту білків досліджуваних зразків (супернатант). За допомогою мікропіпетки обережно нашаровують електродний буфер у лунки та заповнюють буфером верхню і нижню камери. Накривають запобіжною кришкою та під'єднують електроди до блоку живлення так, щоб верхній електрод виконував функцію катода, а нижній – анода.

7. Електрофорез проводять за таких параметрів: сила струму (I) – 15 мА – 20 хв; I – 35 мА – 15 хв; I – 40 мА – до завершення. Інші параметри (V – напруга та W – потужність) виставляють на максимальні значення. Загальна тривалість електрофорезу – 4 год.

8. Фарбування та фіксацію білків проводять одночасно. Для цього касети з гелем розбирають, а пластину з гелем опускають у пластиковий контейнер, який містить 1 л розчину фарби, закривають контейнер кришкою та залишають на 8 год.

9. Після фіксації та фарбування скляну пластину з гелем відмивають, замочуючи її у воді не менше ніж 3 год, підсушують за кімнатної температури, позначають контрольний зразок гібрида та/або батьківські компоненти й фотографують за допомогою системи гель-документації та транслюмінатора видимого світла.

Методика електрофорезу зеїнів кукурудзи (*Zea mays* L.)

Зеїни – спирторозчинні запасні білки кукурудзи, що являють собою поліморфну білкову систему, компоненти якої кодуються великим полігенним комплексом. Значний внутрішньовидовий поліморфізм проламінів кукурудзи передбачає існування множинних алелів за зеїн-кодуючими локусами. Метод електрофорезу запасних білків дає змогу виявити високий рівень поліморфізму зеїнів. Метод ґрунтується на електрофоретичному розділенні зеїнів за допомогою електрофорезу в ПААГ з буферною системою гліцинової кислоти.

1. Обладнання та матеріали:

камера для вертикального електрофорезу (розмір скляних пластин – 20×20 см); спейсерні та короткі скляні пластини (20×20 см); транслюмінатор видимого світла; система гель-документації; термостат із блоком для мікропробірок (температура до 100 °С); лункоутворювачі (гребінки) на 20 лунок; джерело струму; магнітна мішалка з підігрівом; мікроцентрифужні пробірки на 1,5 та 0,5 мл; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; ступка Абіха; вортекс; центрифуга (прискорення не менше ніж 4000 g); шпателі та лотки для зважування реактивів; ваги аналітичні; мірні циліндри різних об'ємів; мірні стакани; спейсери товщиною 0,7 мм; пластиковий контейнер із кришкою для фарбування гелів; фільтрувальний папір; гумові рукавички.

2. Реактиви*:

- акриламід;
- N,N'-метиленабісакриламід;
- сечовина, карбамід;
- трихлороцтова кислота (ТХО) 100%;
- ТЕМЕД (Тетраметилендіамін);
- семиводний сульфат заліза ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$);
- амонію персульфат (ПСА), амоній надсірчаноокислий;
- Bind-Silane (Methacryloxypropyltrimethoxysilane) А 100;
- аскорбінова кислота;
- крижана оцтова кислота;
- гліцин;
- етиловий спирт (95–96%);
- 2-меркаптоетанол;
- піронін G;
- кумасі синій R-250.

*Примітка: ступінь очищення реактивів – «чда» або «хч».

3. Приготування розчинів:

– розчин для екстракції зеїнів (на 50 мл: сечовина – 24,02 г; 2-меркаптоетанол – 1,5 мл;

крижана оцтова кислота – 5 мл; піронін G – на кінчику скальпеля – до інтенсивного рожевого кольору). Зберігають за кімнатної температури у темній тарі без доступу світла до 6 місяців.

– розчин А для приготування гелю (акриламід – 10,62 г; N,N'-метиленабісакриламід – 0,27 г – розчиняють у 30 мл дистильованої води на магнітній мішалці з підігрівом). Використовують одразу для приготування гелю.

– розчин Б для приготування гелю (сечовина – 56,3 г; гліцин – 0,12 г; аскорбінова кислота – 0,06875 г – розчиняють у 50 мл дистильованої води на магнітній мішалці з підігрівом). Використовують одразу для приготування гелю.

– розчин $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (на 5 мл: 0,01 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Використовують одразу для аналізу або зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– гель для електрофорезу (на 125 мл: з'єднують розчини А та Б, додають $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 625 мкл; крижана оцтова кислота – 2,48 мл). До кінцевого об'єму доводять дистильованою водою. Використовують одразу для аналізу або зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– 10% -й розчин ПСА (на 10 мл: 1 г ПСА). Зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– електродний буфер (на 1,5 л: крижана оцтова кислота – 6,0 мл; гліцин – 0,6 г). Використовують одразу для аналізу.

– розчин для фарбування та фіксації білків (на 1 л: кумасі R – 300 мг – розчиняють на магнітній мішалці з підігрівом; крижана оцтова кислота – 60 мл; ТХО – 120 г).

4. Підготовка зразків та екстракція білка

1. Для визначення сортової чистоти використовують 40 насінин досліджуваного гібрида/лінії або батьківського компонента гібрида. З метою визначення ідентичності гібрида/лінії або батьківського компонента гібрида використовують 34 насінини досліджуваного зразка та 6 насінин контрольного зразка гібрида/лінії або батьківського компонента гібрида. У разі проведення аналізу з метою визначення ступеня гібридності використовують 28 насінин досліджуваного зразка гібрида та по 6 насінин обох батьківських компонентів.

2. Із зернівки кукурудзи видаляють зародок, подрібнюють ступкою Абіха. Переносять у мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл і додають по 500 мкл 70% -го розчину етилового спирту та перемішують протягом 30–40 с на вортексі.

3. Екстракцію проводять упродовж 1,5–2 год за кімнатної температури. Центрифугують протягом 10 хв за 4000 g. Відбирають увесь спиртовий супернатант у мікропробірки об'ємом 0,5 мл і випарюють у термостаті за температури 60 °С. Висушені поліпептиди розчиняють у 50 мкл розчину для екстракції зеїнів.

5. Приготування гелю та проведення електрофорезу

1. Скляні пластини знежирюють 95–96% -м спиртом. Спейсерні пластини обробляють 50 мкл розчином Bind-Silane та підсушують протягом 20–30 хв за кімнатної температури.

2. Касети для гелю (спейсерна + коротка) збирають згідно з інструкцією до камери для електрофорезу.

3. Приготований гель використовують для формування пробки. До 20 мл гелю додають 60 мкл ТЕМЕД та 100 мкл 10%-го розчину ПСА, ретельно перемішують і заливають у зібрані касети шаром 7 мм. Полімеризація триває 10 хв.

4. Для заповнення однієї касети використовують 40 мл гелю, до якого додають 120 мкл ТЕМЕД та 200 мкл 10%-го розчину ПСА, ретельно перемішують. Касету заповнюють гелем та відразу вставляють лункоутворювачі. Полімеризація триває 10 хв.

5. Гелеві касети поміщають у камеру для вертикального електрофорезу та закріплю-

ють згідно з інструкцією до камери. Верхню та нижню камери заповнюють електродним буфером. Виймають гребінку та промивають лунки від залишків гелю електродним буфером у спосіб вакуумування.

6. Перед внесенням у лунки гелю розчин білків витримують 5 хв за температури 95 °С. У лунки вносять по 18 мл екстракту білків досліджуваних зразків. Камеру для електрофорезу накривають запобіжною кришкою та під'єднують електроди до блоку живлення так, щоб верхній електрод виконував функцію катода, а нижній – анода.

7. Електрофорез проводять за постійної напруги (V) – 500 V – протягом 5 год. Інші параметри (I – сила струму та W – потужність) виставляють на максимальні значення.

8. Фарбування та фіксацію білків здійснюють одночасно. Для цього касети з гелем розбирають, а пластину з гелем опускають у пластиковий контейнер, який містить 1 л розчину фарби; закривають контейнер кришкою і залишають на 8 год.

9. Після фіксації та фарбування скляну пластину з гелем відмивають, замочуючи її у воді не менше ніж 3 год, підсушують за кімнатної температури, позначають контрольний зразок гібрида та/або батьківські компоненти й фотографують за допомогою системи гель-документації та транслюмінатора видимого світла.

Методика електрофорезу проламінів злаків: пшениці (*Triticum L.*) (гліadini), жита (*Secale cereale L.*) (секаліни), вівса (*Avena L.*) (авеніни) та тритикале (*Triticosecale Witt.*) (гліadini)

Проламіни є найбільшою групою запасних білків злакових культур. Вони розчиняються у 60–80% -му розчині етилового спирту. Проламіни містять понад 40% залишків глютамінової кислоти і приблизно 15% проліну. Відрізняються низькою кількістю лізину. Гетерогенна структура проламінів дає змогу розділити їх за допомогою хроматографії та електрофорезу на компоненти, близькі за амінокислотним складом, проте різні за молекулярною масою і електричним зарядом. Метод ґрунтується на електрофоретичному розділенні зеїнів за допомогою електрофорезу в ПААГ із буферною системою гліцин-оцтова кислота.

1. Обладнання та матеріали:

камера для вертикального електрофорезу (розмір скляних пластин – 20×20 см); спейсерні та короткі скляні пластини (20×20 см);

транслюмінатор видимого світла; система гель-документації; термостат із блоком для мікропробірок (температура до 100 °С); лункоутворювачі (гребінки) на 20 лунок; джерело струму; магнітна мішалка з підігрівом; мікроцентрифужні пробірки на 0,5 мл; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; ступка Абіха; вортекс; центрифуга (прискорення не менше ніж 4000 g); шпателі та лотки для зважування реактивів; ваги аналітичні; мірні циліндри різних об'ємів; мірні стакани; спейсери товщиною 0,7 мм; пластиковий контейнер із кришкою для фарбування гелів; фільтрувальний папір; гумові рукавички.

2. Реактиви*:

- акриламід;
- N,N'-метиленбісакриламід;

- сечовина, карбамід;
- трихлороцтова кислота (ТХО) 100%;
- ТЕМЕД (Тетраметилендіамін);
- семиводний сульфат заліза ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$);
- амонію персульфат (ПСА), амоній надсірчаноокислий;
- Bind-Silane (Methacryloxypropyltrimethoxysilane) А 100;
- аскорбінова кислота;
- крижана оцтова кислота;
- гліцин;
- етиловий спирт (95–96%);
- піронін G;
- кумасі синій R-250.

*Примітка: ступінь очищення реактивів – «чда» або «хч».

3. Приготування розчинів:

– розчин для екстракції білків (на 50 мл: сечовина – 28,5 г; крижана оцтова кислота – 1,5 мл; піронін G – на кінчику скальпеля – до інтенсивного рожевого кольору). Зберігають за кімнатної температури у темній тарі без доступу світла до 6 місяців.

– розчин А для приготування гелю (акриламід – 8,0 г; N,N'-метиленбісакриламід – 0,33 г – розчиняють у 12 мл дистильованої води на магнітній мішалці з підігрівом). Використовують одразу для приготування гелю.

– розчин Б для приготування гелю (сечовина – 48,0 г; гліцин 0,1 г; аскорбінова кислота – 0,033 г – розчиняють у 60 мл дистильованої води на магнітній мішалці з підігрівом). Використовують одразу для приготування гелю.

– розчин В для приготування гелю (на 10 мл: 0,007 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Використовують одразу для аналізу або зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– гель для електрофорезу (на 100 мл: з'єднують розчини А та Б, додають 2 мл розчину В для приготування гелю). До кінцевого об'єму доводять дистильованою водою. Використовують одразу для аналізу або зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– 10% -й розчин ПСА (на 10 мл: 1 г ПСА). Зберігають за температури 4 °С до 1 тижня.

– електродний буфер (на 1,5 л: крижана оцтова кислота – 6,0 мл; гліцин – 0,6 г). Використовують одразу для аналізу.

– розчин для фарбування та фіксації білків (на 1 л: кумасі R – 300 мг – розчиняють на магнітній мішалці з підігрівом; крижана оцтова кислота – 60 мл; ТХО – 120 г).

4. Підготовка зразків та екстракція білка

1. Для визначення сортової чистоти використовують 40 насінин досліджуваного зразка сорту. З метою визначення ідентичності сорту використовують 34 насінини

досліджуваного зразка сорту та 6 насінин контрольного сорту.

2. Кожну насінину подрібнюють ступкою Абіха та переносять у мікроцентрифужну пробірку об'ємом 0,5 мл. Додають по 200 мкл 70% -го розчину етилового спирту й перемішують протягом 30–40 с на вортексі.

3. Екстракцію проводять упродовж 1,5–2 год за температури 45 °С. Центрифугують протягом 5 хв за 2000 g. Відбирають 100 мкл спиртового супернатанта в чисті пробірки і додають по 200 мкл розчину для екстракції білків. Для випаровування спирту пробірки з розчином залишають відкритими на ніч за кімнатної температури.

5. Приготування гелю та проведення електрофорезу

1. Скляні пластини знежирюють 95–96% -м спиртом. Спейсерні пластини обробляють 50 мкл розчином Bind-Silane та підсушують протягом 20–30 хв за кімнатної температури.

2. Касети для гелю (спейсерна + коротка) збирають згідно з інструкцією до камери для електрофорезу.

3. Приготований гель використовують для формування пробки. До 20 мл гелю додають 10 мкл ТЕМЕД та 50 мкл 10% -го розчину ПСА, ретельно перемішують і заливають у зібрані касети шаром 7 мм. Полімеризація триває 10 хв.

4. Для заповнення однієї касети використовують 35 мл гелю, до якого додають 4,4 мкл ТЕМЕД та 44 мкл 10% -го розчину ПСА, ретельно перемішують. Касету заповнюють гелем та відразу вставляють лункоутворювачі. Полімеризація триває 15 хв.

5. Гелеві касети поміщають у камеру для вертикального електрофорезу та закріплюють згідно з інструкцією до камери. Обережно виймають лункоутворювач, видаляють залишки вологи за допомогою фільтрувального паперу.

6. У лунки вносять по 30 мкл екстракту білків досліджуваних зразків. За допомогою мікропіпетки обережно нашаровують електродний буфер у лунки. Верхню та нижню камери заповнюють електродним буфером. Камеру для електрофорезу накривають запобіжною кришкою та під'єднують електроди до блоку живлення так, щоб верхній електрод виконував функцію катода, а нижній – анода.

7. Електрофорез проводять за таких параметрів: сила струму (I) – 15 mA – 15 хв; I – 35 mA – 15 хв; I – 45 mA – до завершення. Інші параметри (V – напруга та W – потужність) виставляють на максимальні значення.

Загальна тривалість електрофорезу – 6 год.

8. Фарбування та фіксацію білків здійснюють одночасно. Для цього касети з гелем розбирають, а пластину з гелем опускають у пластиковий контейнер, який містить 1 л розчину фарби; контейнер закривають кришкою та залишають на 8 год.

9. Після фіксації та фарбування скляну пластину з гелем відмивають, замочуючи її у воді не менше ніж 3 год, підсушують за кімнатної температури, позначають контрольний зразок гібрида та/або батьківські компоненти й фотографують за допомогою системи гель-документації та транслюмінатора видимого світла.

Інтерпретація результатів електрофорезу запасних білків

Визначення сортової чистоти: отримані електрофоретичні спектри запасних білків кожної насінини досліджуваного сорту/гібрида/лінії/батьківського компонента гібрида аналізують за однорідністю, тобто визначають кількість насінин з однотипними спектрами. Сорт вважають однорідним за запасними білками насіння, якщо всі насінини вибірки мають один, характерний для цього сорту, тип спектрів запасних білків. Наявність насінин з іншими типами спектрів свідчить про забрудненість сорту або його генетичну неоднорідність.

Сортову чистоту (Ч) виражають у відсотках і обчислюють за формулою:

$$Ч = E/K \times 100\%, \quad (1)$$

де: E – кількість насінин досліджуваного сорту з характерним типом спектрів, шт.;

K – кількість проаналізованих насінин, шт.

За наявності у зразка декількох електрофоретичних спектрів підраховують кількість насінин з однотипними спектрами та виражають у відсотках вміст кожного.

Визначення ідентичності сорту/гібрида/лінії/батьківського компонента гібрида: отримані електрофоретичні спектри запасних білків кожної насінини досліджуваного сорту порівнюють зі спектрами відповідного контрольного зразка. За кількістю насінин з однотипними електрофоретичними спектрами, характерними для контрольного сорту, визначають

ідентичність досліджуваного сорту (I), яку виражають у відсотках та обчислюють за формулою:

$$I = C/K \times 100\%, \quad (2)$$

де: C – кількість насінин досліджуваного сорту зі спектрами, ідентичними спектрам контрольного зразка сорту, шт.;

K – кількість проаналізованих насінин, шт.

За наявності у зразка декількох електрофоретичних спектрів підраховують кількість насінин з однотипними спектрами та виражають у відсотках вміст кожного.

Визначення ступеня гібридності: за отриманими електрофоретичними спектрами батьківських компонентів визначають маркерну зону (відмінні за молекулярною масою поліпептиди у материнського та батьківського компонентів, які успадковуються гібридом) та підраховують кількість насінин із гібридними спектрами. Ступінь гібридності (Cr) виражають у відсотках і обчислюють за формулою:

$$Cr = G/K \times 100\%, \quad (3)$$

де: G – кількість насінин із гібридними електрофоретичними спектрами, шт.;

K – кількість проаналізованих насінин гібрида, шт.

За наявності у зразка декількох електрофоретичних спектрів підраховують кількість насінин з однотипними спектрами та виражають у відсотках вміст кожного.

Частина 2.

Методики дослідження з молекулярно-генетичного маркування та паспортизації рослин

Молекулярно-генетичне маркування рослин передбачає одержання відомостей про специфічність ділянок геному певного генотипу. Специфічність виявляють за допомогою набору маркерів ДНК. Найчастіше ці маркери не мають вираженого фенотипового ефекту та є так званими мітками геному. Оптимізуючи набори молекулярних маркерів, можна отримати унікальні генетичні профілі кожного конкретного генотипу – генетичні паспорти. Зіставлення генетичних профілів дає змогу ідентифікувати генотипи, встановлювати спорідненість, відповідність сорту, сортової чистоти тощо.

У сучасних дослідженнях із вивчення генетичного різноманіття найбільш затребуваними та високоефективними виявилися мікросателітні маркери (SSR – Simple Sequence Repeats) та маркери, що дають змогу ідентифікувати однонуклеотидний поліморфізм (SNP – Single-Nucleotide Polymorphism).

Аналіз із використанням ДНК-маркерів складається з таких етапів:

- а) екстракція ДНК;
- б) ПЛР;
- в) розділення та візуалізація продуктів ПЛР.

Екстракція ДНК із рослинного матеріалу (рідинно-фазний метод)*

1. Обладнання та матеріали:

– аналітичні ваги; мікроцентрифуга з ротором для мікропробірок (прискорення не менше ніж 12000 g); термостат для мікропробірок (орієнтовний діапазон температур – 10–100 °С); вортекс; витяжна шафа; сушарка вакуумна (за потреби); фарфорові ступки та пестики (у разі екстракції ДНК із проростків або частини рослини); шпателі та плашки для наважок; холодильник із морозильною камерою (температура не менше ніж -20 °С); мікропробірки на 1,5–2 мл; штативи для пробірок; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; спектрофотометр (спектральний діапазон від 260 нм); одноразові кювети.

2. Реактиви*:

– ізопропіловий спирт; ізопропанол; 2-пропанол – $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$;
– EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid; етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль дигідрат – $\text{Na}_2\text{EDTA}\times 2\text{H}_2\text{O}$, EDTA;
– етиловий спирт; етанол – $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$;
– Tris (hydroxymethyl) aminomethane; 2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіол; тріс; TRIZMA – $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$;
– хлорид натрію – NaCl;

– хлороформ; трихлорметан; метилтрихлорид – CHCl_3 ;
– СТАВ; cetyltrimethylammonium bromide; ЦТАБ – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$;
– н-Гексан, норм-Гексан – $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$;
– гідроксид натрію – NaOH;
– хлороводнева кислота – HCl;
– деіонізована вода.

* *Примітка:* ступінь очищення реактивів – «чда».

3. Приготування розчинів:

– 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 мМ EDTA; 100мМ Tris-HCl; 1,4 М NaCl; 2% СТАВ. Зберігають за температури 4 °С 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 М NaCl. Розчин зберігають за температури 4 °С до 4 місяців;

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

– розчин 1,2 М NaCl (на 100 мл: NaCl – 7 г). Зберігають за кімнатної температури до 6 місяців;

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

– розчин для відмивання (70%-й етиловий спирт). Розчин зберігають за кімнатної температури до 6 місяців;

– розчин ТЕ (на 200 мл: 0,5 М EDTA рН 8,0 – 400 мкл; 1 М Tris-HCl рН 8,0 – 1 мл). Кінцеві концентрації ТЕ розчину: 1мМ EDTA рН 8,0; 10 мМ Tris-HCl рН 8,0. Розчин зберігають за температури 4 °С до 6 місяців;

– розчин 0,5 М EDTA (на 200 мл: 37,22 г EDTA, рН розчину – 8,0). Зберігають за температури 4 °С до 6 місяців;

– розчин 1 М Tris-HCl (на 200 мл: 24,2 г Tris, рН розчину – 8,0). Зберігають за температури 4 °С до 6 місяців;

– рН розчинів регулюють за допомогою 1 М NaOH або концентрованої HCl.

4. Проведення екстракції ДНК

1. Для виділення ДНК використовують подрібнені до стану борошна зернівки (наважка – 25 мг), проростки насіння, отримані відповідно до чинних ДСТУ, та частини рослини – молоді листки (наважка 50 мг).

2. Наважку зразка змішують або розтирають у ступці (у разі екстракції ДНК із проростків або частини рослини) з 500 мкл лізуючого розчину та переносять у мікроцентрифужну пробірку.

У разі екстракції ДНК із насіння соняшнику перед етапом лізису до наважки зразка додають 500 мкл н-гексану та вортексують. Інкують протягом 30 хв за кімнатної температури та повністю видаляють н-гексан. Осад висушують до повного випаровування н-гексану.

3. Інкують за температури 65 °С протягом 45 хв. Після цього центрифугують за 13000 g протягом 10 хв.

4. Весь супернатант ~300 мкл переносять у нову мікроцентрифужну пробірку та дода-

ють хлороформ до відібраного супернатанта у співвідношенні 1:1, обережно перемішують протягом 30 с.

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

6. Після центрифугування за 1000 g протягом 5 хв додають 2 об'єми (~500 мкл) розчину для преципітації та обережно перемішують.

7. Інкують упродовж 60 хв за кімнатної температури.

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

9. Розчиняють преципітат у 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%-го етилового спирту, обережно перемішують.

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

12. Сухий осад, в якому міститься ДНК, розчиняють у 50 мкл розчину ТЕ. Отриману ДНК одразу використовують для проведення ПЛР або зберігають за температури +4 °С не більше ніж один місяць.

13. Концентрацію та чистоту ДНК визначають за допомогою спектрофотометра при довжинах хвиль 260 та 280 нм.

**Примітка:* в описаній процедурі екстракції ДНК рідинно-фазним методом як лізуючий агент застосовано СТАВ, осадження білків здійснюють за допомогою хлороформу, а осадження ДНК – ізопропілового спирту.

Екстракція ДНК із рослинного матеріалу (твердофазний метод)*

1. Обладнання та матеріали:

– аналітичні ваги; мікроцентрифуга з ротором для мікропробірок (прискорення не менше ніж 10000 g); витяжна шафа; фарфорові ступки та пестики (у разі екстракції ДНК із проростків або частини рослини); сумісний із магнітним сорбентом магнітний сепаратор; шпателі та плашки для наважок; мікропробірки на 1,5–2 мл; сумісні з магнітним сепаратором плашки або пробірки (у разі відсут-

ності в наборі); штативи для пробірок; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; спектрофотометр (спектральний діапазон від 260 нм); одnorазові кювети.

2. Реактиви*:

– набір реактивів для екстракції ДНК на основі магнітного сорбенту;

– етиловий спирт; етанол – $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$;

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

– EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid; етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль дигідрат – $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EDTA;
 – Tris (hydroxymethyl) aminomethane; 2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіол; тріс; TRIZMA – $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$;
 – н-Гексан, норм-Гексан – $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$;
 – деіонізована вода.
 * *Примітка:* ступінь очищення реактивів – «чда»

3. Приготування розчинів:

– спиртовий розчин для відмивання: 20 мл 96%-го етилового спирту та 20 мл ізопропілового спирту додають до буфера для відмивання (Wash Solution). Загальний об'єм – 80 мл. Зберігають за кімнатної температури в ретельно закритій тарі до 6 місяців.

– MagneSil®/Lysis Buffer B: готують безпосередньо перед використанням відповідно до кількості зразків. Для 8 зразків (1 стовпчик плашки): 85 мл ретельно перемішаних магнітних часточок MagneSil®PMPs додають до 540 мл лізуючого буферу (Lysis Buffer B). На один стовпчик 96-лункової плашки з U-подібним дном використовують 480 мл розчину MagneSil®/Lysis Buffer B. Для більшої кількості зразків збільшують об'єм пропорційно.

– розчин TE (на 200 мл: 0,5 М EDTA рН 8,0 – 400 мкл; 1 М Tris-HCl рН 8,0 – 1 мл). Кінцеві концентрації TE розчину: 1мМ EDTA рН 8,0; 10 мМ Tris-HCl рН 8,0. Розчин зберігають за температури 4 °С до 6 місяців.

– розчин 0,5 М EDTA (на 200 мл: 37,22 г EDTA, рН розчину – 8,0). Зберігають за температури 4 °С до 6 місяців.

– розчин 1 М Tris-HCl (на 200 мл: 24,2 г Tris, рН розчину – 8,0). Зберігають за температури 4 °С до 6 місяців.

4. Проведення екстракції ДНК

1. Для виділення ДНК використовують подрібнені до стану борошна зернівки (наважка – 25 мг), проростки насіння, отримані відповідно до чинних ДСТУ, та частини рослини – молоді листки (наважка – 50 мг).

2. Наважку зразка змішують або розтирають у ступці (у разі екстракції ДНК із проростків або частини рослини) з 300 мкл лізуючого буферу Lysis Buffer A та переносять у пробірки об'ємом 1,5 мл.

Перед етапом лізису у разі екстракції ДНК із насіння соняшнику до наважки зразка додають 500 мкл н-гексану та вортексують. Інкують протягом 30 хв за кімнатної температури та повністю видаляють

н-гексан. Осад висушують до повного випаровування н-гексану.

3. Центрифугують за 10000 г упродовж 10 хв.

4. 125 мкл кожного зразка переносять у відповідну лунку 96-лункової плашки з U-подібним дном. Під час перенесення супернатанта слід уникати відсмоктування осаду або частинок рослинного матеріалу.

5. У кожну лунку додають по 60 мкл суміші MagneSil®/Lysis Buffer B, перемішують способом піпетування.

6. Інкують за кімнатної температури протягом 5 хв, ресуспендують один раз способом піпетування.

7. Плашку встановлюють на 1 хвилину на магнітний сепаратор MagnaBot®96, використовуючи MagnaBot®Spacer. Супернатант видаляють.

8. Плашку виймають із магнітного сепаратора MagnaBot®96 та додають по 150 мкл спиртового розчину для відмивання. Суміш ресуспендують способом піпетування протягом 10–15 секунд.

9. Плашку встановлюють на магнітний сепаратор MagnaBot®96 за допомогою MagnaBot®Spacer на 30 секунд та видаляють супернатант.

10. Повторюють пункти 8–9, використовуючи по 100 мкл спиртового розчину для відмивання.

11. Після останнього відмивання видаляють весь супернатант і висушують осад за кімнатної температури протягом 5 хв.

12. Плашку виймають із магнітного сепаратора MagnaBot®96 та додають 50 мкл розчину TE або води вільної від нуклеаз. Ретельно суспендують способом піпетування та інкують за кімнатної температури протягом 5 хвилин.

13. Плашку встановлюють на магнітний сепаратор MagnaBot®96 за допомогою MagnaBot®Spacer на 1 хвилину. ДНК-розчин переносять у свіжу 96-лункову плашку або в окремі пробірки. Отриману ДНК одразу використовують для проведення ПЛР або зберігають за температури +4 °С не більше ніж один місяць.

14. Концентрацію та чистоту ДНК визначають за допомогою спектрофотометра, якщо довжини хвиль становлять 260 та 280 нм.

**Примітка:* процедуру проведення екстракції ДНК твердофазним методом описано для набору Wizard® Magnetic 96 DNA Plant System (Promega, США).

SSR та EST-SSR аналіз сортів рослин

Аналіз простих мікросателітних повторів (SSR) базується на поліморфізмі ДНК, зумовленому різною кількістю повторів у мотиві послідовності. Довжина такого мотиву (мікросателіта) становить від двох до п'яти пар основ. SSR маркери можуть перебувати як в кодуючих, так і некодуючих регіонах генома.

EST-SSR маркери (Expressed Sequence Tag-SSR) безпосередньо пов'язані з експресуючими ділянками генів. Основні їхні переваги – тісний зв'язок із певними ознаками та високий рівень успадкування. Такі маркери широко використовують для аналізу генетичного різноманіття та структури популяцій.

1. Обладнання та матеріали для ПЛР:

ампліфікатор (термоциклер); мікроцентрифуга з ротором для мікропробірок; мікроцентрифуга з ротором під плашки (прискорення не менше ніж 2000 g); вортекс; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; пробірки об'ємом 1,5–2,0 мл; пробірки або плашки для ПЛР, сумісні з термоблоком ампліфікатора; штативи для пробірок; кришки для пробірок або покривна плівка для плашок.

2. Реактиви для ПЛР:

– реактиви для ПЛР: термостабільна ДНК полімераза, дезоксинуклеотидтрифосфати (dNTP), ПЛР буфер, MgCl₂ (у складі

ПЛР буфера або окремо), праймери, вода для ПЛР.

3. Умови проведення ПЛР

1. Розраховують кількість компонентів реакційної суміші для проведення ПЛР відповідно до їхніх кінцевих концентрацій у загальному об'ємі реакції.

2. Реакційну суміш готують у пробірці об'ємом 1,5–2,0 мл. Розрахунок компонентів ПЛР здійснюють, враховуючи можливі втрати під час внесення суміші у пробірки або плашки для ПЛР (фактична кількість зразків +10% від фактичної кількості зразків).

3. Кількість реакційної суміші, яка відповідає параметрам ПЛР, визначеним для певних SSR маркерів, додають у кожен пробірку або лунку плашки для ПЛР.

4. Після цього у кожен пробірку або лунку плашки для ПЛР додають відповідну параметрам ПЛР кількість ДНК. Всі операції бажано проводити на льоду з метою уникнення утворення неспецифічних фрагментів реакції.

5. Готову реакційну суміш центрифугують для осадження крапель і бульбашок протягом 15 с за 2000 g. Пробірки або плашки з реакційною сумішшю поміщають в ампліфікатор та задають параметри ПЛР.

SSR аналіз ліній і гібридів кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.)

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

– для визначення ступеня гібридності: 20 насінин/рослин гібрида, по 3 насінини/рослини обох батьківських компонентів для простого гібрида, по 5 насінин/рослин обох батьківських компонентів для трилінійного гібрида;

– для визначення відмінності та сортової чистоти ліній і гібридів: 30 насінин/рослин;

– для визначення ідентичності ліній і гібридів: 25 насінин/рослин, 5 насінин/рослин контрольного зразка лінії та гібрида.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів представлено в таблиці 1 додатка 1. Склад реакційної суміші та параметри ПЛР наведено в таблицях 2.1–2.2.

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	1,8 мМ
dNTP	250 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,25 мкМ
Зворотний праймер	0,25 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 20 нг/мкл)	1,5 мкл (~2,5 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.2. Параметри ПЛР

1 цикл	10 циклів (TD від 64 °C до 55 °C)		30 циклів		1 цикл	1 цикл
94 °C 10:00*	94 °C 00:30	72 °C 00:30	94 °C 00:30	72 °C 00:30	72 °C 10:00	10 °C ∞
		64 °C 00:30		55 °C 00:30		
Тип реакції – touchdown (TD)						

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Розділення продуктів ПЛР проводять, використовуючи системи капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му ага-

рознаму гелі, за умови, що різниця між генотипами за певним маркером становить не менше ніж 15 п.н.

SSR аналіз гібридів і сортів пшениці (*Triticum L.*)

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

– для визначення ступеня гібридності: 20 насінин/рослин гібрида, по 3 насінини/рослини обох батьківських компонентів;

– для визначення відмінності та сортової чистоти ліній, гібридів і сортів: 30 насінин/рослин;

– для визначення ідентичності ліній, гібридів і сортів: 25 насінин/рослин, 5 насінин/рослин контрольного зразка лінії, гібрида або сорту.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів наведено в таблиці 2 додатка 1, склад реакційної суміші та параметри ПЛР подано в таблицях 2.1–2.2.

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	1,5 мМ
dNTP	200 мкМ
ДНК полімераза	0,05 од.
Прямий праймер	0,05 мкМ
Зворотний праймер	0,05 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація 100 нг/мкл)	1 мкл (~10 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.2. Параметри ПЛР

1 цикл		34 цикли			1 цикл	1 цикл
94 °C 03:00*		72 °C 01:00	94 °C 00:30	58 °C 00:30	72 °C 05:00	10 °C ∞

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Розділення продуктів ПЛР здійснюють, використовуючи системи капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му ага-рознаму гелі, за умови, що різниця між генотипами за певним маркером становить не менше ніж 15 п.н.

SSR аналіз гібридів і сортів ячменю (*Hordeum vulgare L.*)

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

– для визначення ступеня гібридності: 20 насінин/рослин гібрида, по 3 насінини/рослини обох батьківських компонентів;

– для визначення відмінності та сортової чистоти ліній, гібридів і сортів: 30 насінин/рослин;

– для визначення ідентичності ліній, гібридів і сортів: 25 насінин/рослин, 5 насінин/рослин контрольного зразка лінії, гібрида або сорту.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів наведено в таблиці 3 додатка 1, склад реакційної суміші та параметри ПЛР подано в таблицях 2.1–

2.4. Для SSR маркерів ячменю можна застосовувати параметри touchdown (TD) ПЛР (таблиці 2.5–2.6).

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	1,5 мМ
dNTP	200 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,05 мкМ
Зворотний праймер	0,05 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 100 нг/мкл)	1 мкл (~10 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.2. Параметри ПЛР для SSR маркерів 1–8 (додаток 1, таблиця 3)

1 цикл	45 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 03:00*	94 °C 01:00	58 °C 01:00	72 °C 01:00	72 °C 05:00	10 °C ∞

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.3. Параметри ПЛР для SSR маркерів 9–13 (додаток 1, таблиця 3)

1 цикл	45 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 03:00*	94 °C 01:00	55 °C 01:00	72 °C 01:00	72 °C 05:00	10 °C ∞

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.4. Параметри ПЛР для SSR маркерів 14–15 (додаток 1 таблиця 3)

1 цикл	45 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 03:00*	94 °C 01:00	62 °C 01:00	72 °C 01:00	72 °C 05:00	10 °C ∞

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.5. Параметри touchdown (TD) ПЛР (варіант 1)

1 цикл	20 циклів (TD від 64 °C до 55 °C)			28 циклів		1 цикл	1 цикл	1 цикл
94 °C 03:00*	94 °C 00:30	64 °C 00:30	72 °C 00:30	94 °C 00:30	55 °C 00:30	72 °C 05:00	25 °C 05:00	10 °C ∞

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.6. Параметри touchdown (TD) ПЛР (варіант 2)

1 цикл	20 циклів (TD від 59 °C до 50 °C)			28 циклів		1 цикл	1 цикл	1 цикл
94 °C 03:00*	94 °C 00:30	59 °C 00:30	72 °C 00:30	94 °C 00:30	55 °C 00:30	72 °C 05:00	25 °C 05:00	10 °C ∞

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Розділення продуктів ПЛР здійснюють, використовуючи системи капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му ага-

рознаму гелі, за умови, що різниця між генотипами за певним маркером становить не менше ніж 15 п.н.

SSR аналіз ліній і гібридів соняшника однорічного (*Helianthus annuus* L.)

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

– для визначення ступеня гібридності: 20 насінин/рослин гібрида, по 3 насінини/рослини обох батьківських компонентів для простого гібрида, по 5 насінин/рослин обох батьківських компонентів для трилінійного гібрида;
– для визначення відмінності та сортової чистоти ліній і гібридів: 30 насінин/рослин;
– для визначення ідентичності ліній і гібридів: 25 насінин/рослин, 5 насінин/рослин контрольного зразка лінії та гібрида.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів наведено в таблиці 4 додатка 1, склад реакційної су-

міші та параметри ПЛР подано в таблицях 2.1–2.2.

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	1,8 мМ
dNTP	250 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,25 мкМ
Зворотний праймер	0,25 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 20 нг/мкл)	1,5 мкл (~2,5 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.2. Параметри ПЛР

1 цикл	10 циклів (TD від 64 °C до 55 °C)		30 циклів			1 цикл	1 цикл		
94 °C 10:00*	94 °C 00:30		64 °C 00:30	72 °C 00:30	94 °C 00:30	55 °C 00:30	72 °C 00:30	72 °C 10:00	10 °C ∞
Тип реакції – touchdown (TD)									

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Розділення продуктів ПЛР здійснюють, використовуючи системи капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му ага-

рознному гелі, за умови, що різниця між генотипами за певним маркером становить не менше ніж 15 п.н.

SSR аналіз ліній, гібридів і сортів ріпаку (*Brassica napus* L. *oleifera*)

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

– для визначення ступеня гібридності: 20 насінин/рослин гібрида, по 3 насінини/рослини обох батьківських компонентів для простого гібрида, по 5 насінин/рослин обох батьківських компонентів для трилінійного гібрида;

– для визначення відмінності та сортової чистоти ліній, гібридів і сортів: 30 насінин/рослин;

– для визначення ідентичності ліній, гібридів і сортів: 25 насінин/рослин, 5 насінин/рослин контрольного зразка лінії, гібрида або сорту.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів наведено в таблиці 5 додатка 1, склад реакційної суміші та параметри ПЛР подано в таблицях 2.1–2.4.

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР для SSR маркерів 1–23 (додаток 1, таблиця 5)

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	2,5 мМ
dNTP	200 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,5 мкМ
Зворотний праймер	0,5 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 100 нг/мкл)	1 мкл (~10 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.2. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР для SSR маркерів 24–29 (додаток 1, таблиця 5)

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	2,5 мМ
dNTP	200 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,2 мкМ
Зворотний праймер	0,2 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 20 нг/мкл)	3 мкл (~6 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.3. Параметри ПЛР для SSR маркерів 1–23 (додаток 1, таблиця 5)

1 цикл	35 циклів		1 цикл	1 цикл	
92 °C 02:00*	92 °C 00:30		72 °C 01:00	72 °C 10:00	10 °C ∞
		55 °C 00:30			

* Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.4. Параметри ПЛР для SSR маркерів 24–29 (додаток 1, таблиця 5)

1 цикл	35 циклів		1 цикл	1 цикл	
94 °C 05:00*	94 °C 00:45		72 °C 01:00	72 °C 10:00	10 °C ∞
		53 °C** 00:45			

* Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

** Примітка: 49 °C для SSR маркеру FITO-063

Розділення продуктів ПЛР здійснюють, використовуючи системи капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му агарозному гелі, за умови, що різниця між генотипами за певними маркерами становить не менше ніж 15 п.н.

SSR аналіз сортів сої культурної (*Glycine max* (L.) Merrill)

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

- для визначення відмінності та сортової чистоти сортів: 30 насінин/рослин;
- для визначення ідентичності сортів: 25 насінин/рослин, 5 насінин/рослин контрольного зразка сорту.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів наведено в таблиці 6 додатка 1, склад реакційної суміші та параметри ПЛР подано в таблицях 2.1–2.2.

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	2,5 мМ
dNTP	200 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,1 мкМ
Зворотний праймер	0,1 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 20 нг/мкл)	2 мкл (~2 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	25 мкл

Таблиця 2.2. Параметри ПЛР

1 цикл	35 циклів		1 цикл	1 цикл
94 °C 03:00*	93 °C 00:30	60 °C** 01:00	72 °C 01:00	72 °C 03:00
				10 °C ∞

* Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

** Примітка: 55 °C для SSR маркера Satt114; 50 °C для SSR маркера Satt063

Розділення продуктів ПЛР здійснюють, використовуючи систему капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му агарозному гелі, за умови, що різниця між генотипами за певним маркером становить не менше ніж 15 п.н.

SSR аналіз сортів картоплі (*Solanum tuberosum* L.)

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

- для визначення відмінності сортів: 2 бульби/рослини;
- для визначення ідентичності сортів: 2 бульби/рослини, 2 бульби/рослини контрольного зразка сорту;
- для визначення сортової чистоти: 30 бульб/рослин.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів наведено в таблиці 7 додатка 1, склад реакційної суміші та параметри ПЛР подано в таблицях 2.1–2.2.

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	1,8 мМ
dNTP	250 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,25 мкМ
Зворотний праймер	0,25 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 20 нг/мкл)	1,5 мкл (~2,5 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.2. Параметри ПЛР

1 цикл	40 циклів		1 цикл	1 цикл
95 °C 05:00*	95 °C 00:45	50 °C** 00:30	72 °C 01:30	72 °C 07:00
				10 °C ∞

* Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

** Примітка: 60 °C для SSR маркерів STM3012 і STM5136

Розділення продуктів ПЛР здійснюють, використовуючи системи капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му агарозному гелі, за умови, що різниця між генотипами за певним маркером становить не менше ніж 15 п.н.

EST-SSR аналіз сортів часнику (*Allium sativum* L.)

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

- для визначення відмінності сортів: 2 цибулини/рослини;
- для визначення ідентичності сортів: 2 цибулини/рослини, 2 цибулини/рослини контрольного зразка сорту;
- для визначення сортової чистоти: 30 цибулин/рослин.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів наведено в таблиці 8 додатка 1, склад реакційної суміші та параметри ПЛР подано в таблицях 2.1–2.6.

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1×
MgCl ₂	2,5 мМ
dNTP	250 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,6 мкМ
Зворотний праймер	0,6 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 20 нг/мкл)	1,5 мкл (~2,5 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.2. Параметри ПЛР для EST-SSR маркерів 1–5 (додаток 1, таблиця 8)

1 цикл	6 циклів (TD від 62 °C до 57 °C)			28 циклів			7 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 02:00*	94 °C 00:45		72 °C 01:10	94 °C 00:45		72 °C 01:10	94 °C 00:45		72 °C 01:10	72 °C 15:00	10 °C ∞
		62 °C 01:00			57 °C 01:00			54 °C 01:00			
Тип реакції – touchdown (TD)											

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.3. Параметри ПЛР для EST-SSR маркерів 6–7 (додаток 1, таблиця 8)

1 цикл	6 циклів (TD від 60 °C до 55 °C)			28 циклів			7 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 02:00*	94 °C 00:45		72 °C 01:10	94 °C 00:45		72 °C 01:10	94 °C 00:45		72 °C 01:10	72 °C 15:00	10 °C ∞
		60 °C 01:00			55 °C 01:00			54 °C 01:00			
Тип реакції – touchdown (TD)											

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.4. Параметри ПЛР для EST-SSR маркера 8 (додаток 1, таблиця 8)

1 цикл	6 циклів (TD від 65 °C до 60 °C)			28 циклів			7 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 02:00*	94 °C 00:45		72 °C 01:10	94 °C 00:45		72 °C 01:10	94 °C 00:45		72 °C 01:10	72 °C 15:00	10 °C ∞
		65 °C 01:00			60 °C 01:00			54 °C 01:00			
Тип реакції – touchdown (TD)											

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.5. Параметри ПЛР для EST-SSR маркера 9 (додаток 1, таблиця 8)

1 цикл	6 циклів (TD від 63 °C до 58 °C)			28 циклів			7 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 02:00*	94 °C 00:45		72 °C 01:10	94 °C 00:45		72 °C 01:10	94 °C 00:45		72 °C 01:10	72 °C 15:00	10 °C ∞
		63 °C 01:00			58 °C 01:00			54 °C 01:00			
Тип реакції – touchdown (TD)											

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Таблиця 2.6. Параметри ПЛР для EST-SSR маркера 10 (додаток 1, таблиця 8)

1 цикл	6 циклів (TD від 64 °C до 59 °C)			28 циклів			7 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 02:00*	94 °C 00:45	64 °C 01:00	72 °C 01:10	94 °C 00:45	59 °C 01:00	72 °C 01:10	94 °C 00:45	54 °C 01:00	72 °C 01:10	72 °C 15:00	10 °C ∞
Тип реакції – touchdown (TD)											

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Розділення продуктів ПЛР здійснюють, використовуючи системи капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му ага-

рознному гелі, за умови, що різниця між генотипами за певним маркером становить не менше ніж 15 п.н.

EST-SSR аналіз сортів салату посівного (*Lactuca sativa* L.) та всіх його типів

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

- для визначення відмінності та сортової чистоти сортів: 30 насінин/рослин;
- для визначення ідентичності сортів: 25 насінин/рослин, 5 насінин/рослин контрольного зразка сорту.

2. Параметри ПЛР-аналізу

Характеристики праймерів наведено в таблиці 9 додатка 1, склад реакційної суміші та параметри ПЛР подано в таблицях 2.1–2.2.

Таблиця 2.1. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
ПЛР буфер	1x
MgCl ₂	2,5 мМ
dNTP	100 мкМ
ДНК полімераза	1 од.
Прямий праймер	0,4 мкМ
Зворотний праймер	0,4 мкМ
Вода для ПЛР	–
ДНК (концентрація – 20 нг/мкл)	1 мкл (~2 нг/мкл)
Загальний об'єм реакції	10 мкл

Таблиця 2.2. Параметри ПЛР

1 цикл	40 циклів			1 цикл	1 цикл
94 °C 04:00*	94 °C 00:30	55 °C 00:30	72 °C 00:45	72 °C 10:00	10 °C ∞

*Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини: секунди»

Розділення продуктів ПЛР здійснюють, використовуючи системи капілярного електрофорезу або електрофорезу в 6% -му агарозному гелі, за умови, що різниця між генотипами за певним маркером становить не менше ніж 15 п.н.

Розділення та візуалізація продуктів ПЛР – капілярний електрофорез продуктів ПЛР

1. Обладнання та матеріали для капілярного електрофорезу:

мікроцентрифуга з ротором для мікропробірок; мікроцентрифуга з ротором під плашки (прискорення не менше ніж 2000 g); вортекс; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; пробірки об'ємом 1,5–2,0 мл; штативи для пробірок; система капілярного електрофорезу з детекцією флуоресценції (аналізатор нуклеїнових кислот); ка-

пілярна матриця з робочою довжиною капілярів не менше ніж 33 см; плашки, сумісні з системою капілярного електрофорезу: для зразків, для буферних розчинів; мірні циліндри.

2. Реактиви для капілярного електрофорезу:

– набір реактивів для капілярного електрофорезу (розмір ампліконів – 50–1500 п.н.), деіонізована вода (ступінь очищення не менше ніж 18,2 МОм).

3. Умови проведення капілярного електрофорезу*

Принцип цього методу базується на автоматичному високопродуктивному розділенні нуклеїнових кислот у тонких трубках капілярів (зовнішній діаметр – 50 мкм), заповнених гелевими матрицями, під дією електричного поля. Детекція розділених за розмірами нуклеїнових кислот відбувається в кінцевій точці капілярів за рахунок флюоресценції чутливого інтеркалюючого барвника, який перебуває в матриці гелю у процесі аналізу та випромінює флюоресценцію, коли зв'язується з молекулами нуклеїнових кислот.

Для проведення капілярного електрофорезу користуються інструкцією до приладу, яким оснащена лабораторія, та інструкцією до набору реактивів для капілярного електрофорезу відповідно до довжини капілярної матриці.

1. Необхідні плашки для аналізу: плашка для зразків на 96 лунок, плашка для маркера молекулярної маси та плашка для зберігання капілярів – 96-лункові ПЛР-плашки з напів юбною (Semi-skirted 96-Well PCR Plates); плашка для вхідного буфера та відходів – 96-лункові (глибокі лунки із заокругленим дном) плашки об'ємом 1 мл (Deep 96-Well Plates).

2. У програмному вікні обирають тип набору реактивів для капілярного електрофорезу, довжину матриці капілярів, задають об'єм гелю і кондиціонуючого буфера та підписують зразки.

3. Підготовка гелю: для аналізу 96 зразків наповнюють відповідну ємність 40 мл гелю та додають 4 мкл інтеркалюючого барвника. Ретельно перемішують, уникаючи утворення бульбашок, і під'єднують до системи закачування гелю у приладі.

4. Підготовка кондиціонуючого буфера: готують 1×кондиціонуючий буфер (5×кондиціонуючий буфер розводять деіонізованою водою). Для аналізу 96 зразків наповнюють відповідну ємність 40 мл 1×кондиціонуючого буфера та під'єднують до системи закачування буфера у приладі.

5. Підготовка плашки для вхідного буфера: у кожну лунку 96-лункової плашки Deep 96-Well Plate вносять по 1 мл 1×вхідного буфера. Плашку, наповнену буфером,

поміщають у шухлядку «В» приладу. Буфер із плашкою необхідно змінювати щодня.

6. Підготовка плашки для маркера молекулярної маси: у кожну лунку 96-лункової плашки Semi-skirted 96-Well PCR Plate вносять по 30 мкл розчину, що містить верхній та нижній маркери молекулярної маси (1 та 500 п.н.). На нанесений розчин маркерів додають по 20 мкл мінеральної олії. Підготовлену плашку поміщають у шухлядку «М» приладу. Плашка з розчином маркерів розрахована не менше ніж на 30 розділень.

7. Порожню плашку Deep 96-Well Plate розміщують у шухлядці «W». У неї з капілярів зливається частина відпрацьованих буферів.

8. Підготовка плашки з буфером для зберігання капілярів: у кожну лунку 96-лункової плашки Semi-skirted 96-Well PCR Plate вносять по 100 мкл буфера для зберігання капілярів та розміщують плашку в шухлядці №3.

9. Підготовка плашки зразків: у кожну лунку (крім H12) плашки Semi-skirted 96-Well PCR Plate вносять по 22 мкл 1×TE буфера для розбавлення та по 2 мкл зразків (продуктів ПЛР). У лунку H12 вносять маркер молекулярної маси 35–400 п.н. Вміст лунок необхідно ретельно перемішати, уникаючи утворення бульбашок, а потім центрифувати протягом 15 с за 2000 g. У разі аналізу меншої кількості зразків лунки заповнюють 1×TE буфером для розбавлення (24 мкл). Плашку зі зразками поміщають в одну з шухлядок №1–2, слідкуючи за тим, щоб зразки стояли в шухлядці, обраній у програмі.

10. Запускають процес розділення, який на довжині матриці 55 см триває приблизно 1,5 години. Після закінчення розділення візуалізація результатів доступна у вигляді графіків із характерними піками й електрофореграми та таблиці даних інтенсивності флюоресценції, кількості та розміру отриманих ампліконів.

*Примітка: процедуру проведення капілярного електрофорезу описано для приладу Fragment Analyzer™ (Agilent, США), капілярна матриця на 96 зразків, робоча довжина – 55 см, роздільна здатність – 3 п.н., набір для проведення капілярного електрофорезу – Agilent DNF-905 dsDNA Kit 1500 bp (Agilent, США).

Розділення та візуалізація продуктів ПЛР – електрофорез продуктів ПЛР в агарозному гелі

1. Обладнання та матеріали:

мікроцентрифуга з ротором під мікропробірки та/або плашки; вортекс; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; система для горизонтального електрофорезу; аналітичні ваги; шпатель; мікрохвильова піч; система гель-документації; транслюмінатор (із випромінюванням в ультрафіолетовому діапазоні).

2. Реактиви*:

– легкоплавка агароза для молекулярної біології (густина >1700 г/см³);

– етидій бромід, бромистий етидій – C₂₁H₂₀BrN₃;

– буфер для нанесення (DNA Gel Loading Dye) (зазвичай використовують 6×буфер);

– маркер молекулярної маси (крок і мінімальний/максимальний розмір фрагментів маркера обирають залежно від очікуваних розмірів ампліконів);

– борна кислота – H₃BO₃;

– EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid; етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль дигідрат – Na₂EDTA×2H₂O, EDTA;

– Tris (hydroxymethyl) aminomethane; 2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіол; тріс; TRIZMA – NH₂C(CH₂OH)₃;

– деіонізована вода (ступінь очищення не менше ніж 18,2 МОм);

– дистильована вода.

* *Примітка:* ступінь очищення реактивів – «чда».

3. Приготування розчинів:

– 5×розчин TBE (на 1 л: Tris – 54,0 г; борна кислота – 27,5 г; EDTA – 3,722 г, рН розчину – 8,0). Зберігають за температури 4 °С не більше ніж 6 місяців. Для проведення електрофорезу та приготування гелю використовують 0,5×розчин TBE.

– 6%-й агарозний гель (на 100 мл гелю: за допомогою мікрохвильової печі розплав-

ляють 6 г агарози у 100 мл 0,5×розчину TBE). До отриманого розчину додають 1 мкл етидіума броміду, обережно перемішують.

4. Умови проведення електрофорезу

1. Готовий гель із бромистим етидієм заливають у попередньо приготовану форму з лункоутворювачами. Гель полімеризується впродовж 20 хв.

2. Після полімеризації гель на підкладці переносять до електрофоретичної камери та виймають лункоутворювачі.

3. Готують суміш продуктів ПЛР та буфера для нанесення. Змішують кожний зразок із буфером для нанесення (кінцева концентрація буфера в розчині – 1×). У разі використання 6×буфера для нанесення: для кожного зразка змішують 3,34 мкл 6×буфера для нанесення, 1,66 мкл деіонізованої води та додають 5 мкл зразка (продукти ПЛР). Кінцевий об'єм суміші для внесення в лунки – 10 мкл.

4. У першу та останню лунки одного рядка додають маркер молекулярної маси. Вносять суміш продуктів ПЛР і буфера для додавання в лунки гелю та під'єднують електрофорезну камеру до джерела струму.

5. Електрофорез проводять за напруженості електричного поля 5 V/см. Тривалість електрофорезу визначають за ступенем розділення маркера молекулярної маси. Для 6%-го агарозного гелю з маркером молекулярної маси GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США) тривалість електрофорезу становить 2,5 години.

6. Після електрофорезу гель поміщають на транслюмінатор і фотографують за допомогою системи гель-документації.

7. Розмір ампліконів визначають відносно маркера молекулярної маси за допомогою відповідного програмного забезпечення (наприклад, TotalLab).

KASP™ аналіз ліній кукурудзи

KASP™ (Kompetitive Allele Specific PCR), розроблена та запатентована компанією LGC Genomics (Велика Британія) технологія генотипування, – це конкурентна алель-специфічна ПЛР, базована на ідентифікації одонуклеотидного поліморфізму (SNP).

1. Мінімальна кількість насінин/рослин на аналіз:

– для визначення відмінності та сортової чистоти ліній: 30 насінин/рослин;

– для визначення ідентичності ліній: 25 насінин/рослин, 5 насінин/рослин контрольного зразка ліній.

2. Обладнання та матеріали для ПЛР:

ампліфікатор (термоциклер) із системою зчитування FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) з відповідними наборами фільтрів (таблиця 2.1) або ампліфікатор (термоциклер) і зчитувач плашок із підтримкою FRET (з відповідними наборами фільтрів) (таблиця 2.1); мікроцентрифуга з ротором для мікропробірок; мікроцентрифуга з ротором під плашки; вортекс; мікропіпетки змінного об'єму; наконечники для мікропіпеток; пробірки об'ємом 1,5–2,0 мл; пробірки або плашки для ПЛР, сумісні з термоблоком ампліфікатора та/або зчитувача плашок; штативи для пробірок; кришки для пробірок або покривна плівка для плашок, придатні для оптичного зчитування флюоресценції.

Таблиця 2.1. Значення збудження та випромінювання для флюорофорів, які використовують у KASP

Флюорофор	Довжина хвиль максимального збудження, нм	Довжина хвиль максимального випромінювання, нм
FAM	485	520
HEX	535	556
ROX	575	610

3. Реактиви для ПЛР:

– KASP Assay Mix – містить специфічні праймери, за якими проводять аналіз. Для аналізу кукурудзи використовують набір SNP маркерів (1200 KASP™ SNP genotyping assays), розроблений у рамках CIMMYT's Global Maize Program та the Generation Challenge Programme. Залежно від мети аналізу можна замовити синтез до 1200 праймерів;

– KASP-TF Master Mix – універсальний набір реактивів для кожного аналізу генотипування KASP. 2×Master Mix містить

ДНК-полімеразу (Taq) в оптимізованому буферному розчині та нейтральний еталонний барвник ROX™.

Постачання всіх реактивів і синтез праймерів здійснюються авторизованою компанією LGC, Biosearch Technologies (Велика Британія).

4. Умови проведення ПЛР

1. Перед першим застосуванням KASP у лабораторії замовляють тестовий набір для ознайомлення з роботою технології та тестування приладів. Після того, як технологію протестовано, починають роботу з набором SNP маркерів кукурудзи.

2. Під час проведення кожної ПЛР включають 2 негативних контролю реакції (NTC – No template controls): 2 пробірки для ПЛР або лунки плашки, які не містять зразків досліджуваної ДНК.

3. Необхідні реактиви для ПЛР розморожують та перемішують на вортексі, осаджують швидким центрифугуванням (15 с за 2000 g).

4. Реакційну суміш (2×KASP-TF Master Mix та KASP Assay Mix) готують у пробірці об'ємом 1,5–2,0 мл відповідно до кількості зразків (фактична кількість + NTC), враховуючи можливі втрати під час внесення суміші у пробірки або плашки для ПЛР (+10% від кількості зразків). Розрахунок здійснюють, зважаючи на те, що для одного зразка використовують 5 мкл 2×KASP-TF Master Mix та 0,14 мкл KASP Assay Mix.

5. У кожному пробірці або лунку плашки для ПЛР додають по 5 мкл реакційної суміші.

6. Після цього в кожному пробірці або лунку плашки для ПЛР додають по 5 мкл ДНК (кінцева концентрація в загальному об'ємі реакції ~2,5 нг/мкл). ДНК екстрагується за використанням рідинно-фазного або твердофазного методу. Загальний об'єм реакції – 10 мкл. Всі операції бажано проводити на льоду з метою уникнення утворення неспецифічних фрагментів реакції.

7. Готову реакційну суміш центрифугують для осадження крапель і бульбашок протягом 15 с за 7000 g. Пробірки або плашки з реакційною сумішшю поміщають в ампліфікатор та задають параметри ПЛР (табл. 4.1).

8. У разі отримання недостатньо чітких кластерів генотипів за каналами HEX та FAM проводять один або кілька коротких

Таблиця 4.1. Параметри ПЛР

Етап	Температура, °C	Тривалість*	Кількість циклів для кожного етапу
1. Гарячий старт (активація Hot-start Taq полімерази)	94	15:00	1
2. Touchdown (TD)	94 61 (температуру знижують з 61 °C на 0,6 °C за кожен цикл до 55 °C – оптимальної температури гібридизації праймерів)	00:20 01:00	10
3. Ампліфікація	94 55	00:20 01:00	26
4. Оптичне зчитування результатів**	30 (або інша температура нижча за 40 °C)	01:00	1

* Примітка: одиниці вимірювання часу – «хвилини:секунди»

** Примітка: цей етап проводять при використанні ампліфікатора з системою зчитування FRET. Якщо використовують ампліфікатор (термоциклер) без системи зчитування, то ПЛР складається з 13 етапів, а результати зчитують, застосовуючи зчитувач плашок із підтримкою FRET, за температури нижче ніж 40 °C.

циклів ампліфікації: денатурація 94 °C – 20 с, гібридизація праймерів/елонгація 57 °C – 60 с. Після цього повторюють зчитування результатів.

9. Первинні дані отриманого одонуклеотидного поліморфізму аналізують, вико-

ристовуючи кластерні графіки для визначення генотипів зразків. Реакційну суміш після проходження ПЛР можна зберігати за температури 4 °C до 1 тижня та повторно зчитати результати після короткого циклу ампліфікації.

Інтерпретація результатів SSR та EST-SSR аналізу сортів рослин

Визначення ступеня гібридності кукурудзи, соняшнику та ріпаку: за отриманими розмірами ампліконів визначають, які амплікони характерні для батьківського та материнського компонентів та відповідно успадковуються гібридом. Ступінь гібридності виражають у відсотках за кожним маркером та обчислюють за формулою:

$$Cr = \Gamma / K \times 100\%, \quad (4)$$

де: Γ – кількість насінин/рослин, яким властиві амплікони, успадковані від обох батьківських компонентів, шт.;

K – кількість проаналізованих насінин/рослин гібрида, шт.

Визначення сортової чистоти: отримані амплікони кожної насінини/рослини за певним маркером досліджуваного сорту/гібрида/лінії/батьківського компонента гібрида аналізують за однорідністю, тобто визначають кількість насінин/рослин, які мають амплікони однакового розміру за певним маркером. Сорт/гібрид/лінія/батьківський компонент гібрида вважаються однорідними за певним маркером, якщо всі насінини/рослини вибірки мають однакові розміри ампліконів. Наявність насінин/рослин, яким властиві амплікони інших роз-

мірів, свідчить про забрудненість сорту або його генетичну неоднорідність.

Сортову чистоту (Ч) виражають у відсотках і обчислюють за формулою:

$$Ч = E / K \times 100\%, \quad (5)$$

де: E – кількість насінин/рослин досліджуваного сорту/гібрида/лінії/батьківського компонента простого гібрида, яким властиві амплікони однакового розміру за певним маркером, шт.;

K – кількість проаналізованих насінин/рослин, шт.

Визначення ідентичності сорту/гібрида/лінії: отримані амплікони кожної насінини/рослини досліджуваних сорту/гібрида/лінії/батьківського компонента гібрида порівнюють з ампліконами контрольного зразка за певним маркером. За кількістю насінин/рослин, що за відповідним маркером мають амплікони певного розміру, характерні для контрольного сорту, визначають ідентичність досліджуваного сорту (І), яку виражають у відсотках та обчислюють за формулою:

$$I = C / K \times 100\%, \quad (6)$$

де: C – кількість насінин/рослин досліджуваного сорту/гібрида/лінії/батьківського компонента гібрида з ампліконами певного розміру, які ідентичні ампліконам контрольного зразка за відповідним маркером, шт.;

K – кількість проаналізованих насінин/рослин, шт.

Для визначення відмінності сортів/гібридів/ліній оцінюють молекулярні дистанції за набором SSR або EST-SSR маркерів для певної культури: за кожним маркером визначають розміри отриманих ампліконів, характерних для кожної насінини/рослини вибірки. Будують бінарну матрицю, у якій наявність/відсутність певного амплікону позначають 1/0 відповідно, та на її основі розраховують молекулярні дистанції.

Для аналізу даних зазвичай використовують коефіцієнти подібності, розраховані за Роджерсом (Rodger's) (7), Неєм та Лі (Nei & Li) (8) або Жаккардом (Jaccard) (9) з Евклідовою мірою відстані:

$$D_r = \frac{1}{n} \sum_j \sqrt{\frac{1}{2} \sum (x_{ij} - y_{ij})^2} \quad (7)$$

$$D_{NL} = \frac{2n_{ij}}{2n_{ij} + n_i + n_j} \quad (8)$$

$$D_j = \frac{n_{ij}}{n_{ij} + n_i + n_j} \quad (9)$$

Для визначення коефіцієнтів подібності та розрахованих на їхній основі молекулярних дистанцій між досліджуваними сортами/гібридами/лініями/батьківськими компонентами використовують програмне забезпечення, яке дає змогу провести відповідні розрахунки (STATISTICA, XLSTAT для Microsoft Excel, IBM SPSS software, R тощо).

Інтерпретація результатів KASP™ аналізу ліній кукурудзи

Визначення ідентичності лінії: однонуклеотидний поліморфізм, визначений у кожній насінини/рослини досліджуваної лінії, порівнюють із контрольним зразком за набором KASP™ маркерів. За кількістю насінин/рослин, що мають однаковий поліморфізм із контрольним зразком, визначають ідентичність досліджуваної лінії (I), яку виражають у відсотках та обчислюють за формулою:

$$I_{KASP} = \frac{C_{KASP}}{K_{KASP}} \times 100\%, \quad (10)$$

де: C_{KASP} – кількість насінин/рослин досліджуваної лінії, яким властивий поліморфізм, ідентичний із контрольним зразком за набором KASP™ маркерів, шт.;

K_{KASP} – загальна кількість проаналізованих насінин/рослин, шт.

Для визначення відмінності ліній оцінюють молекулярні дистанції за набором KASP™ маркерів. Будують бінарну матрицю, у якій однонуклеотидний поліморфізм позначають 1/0 відповідно, та на її основі розраховують молекулярні дистанції.

Для аналізу даних зазвичай використовують коефіцієнти подібності, розраховані за Роджерсом (Rodger's) (7), Неєм та Лі (Nei & Li) (8) або Жаккардом (Jaccard) (9) з Евклідовою мірою відстані.

Для визначення коефіцієнтів подібності та розрахованих на їхній основі молекулярних дистанцій між досліджуваними лініями використовують програмне забезпечення, яке дає змогу провести відповідні розрахунки (STATISTICA, XLSTAT для Microsoft Excel, IBM SPSS software, R тощо).

Список використаних літературних джерел

Вступ

- Міжнародна конвенція з охорони нових сортів рослин ООН; Конвенція, Міжнародний документ від 02.12.1961: станом на 19 березня 1991 р. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/995_856#Text (дата звернення 15.05.2022)
- Про насіння і садивний матеріал: Закон України від 26.12.2002 № 411-IV: станом на 16.10.2020. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/411-15#Text> (дата звернення 15.05.2022).
- Про охорону прав на сорти рослин: Закон України від 21.04.1993 № 3116-XII: станом на 16.10.2020. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3116-12#Text> (дата звернення 15.05.2022)
- Про приєднання України до Міжнародної конвенції з охорони нових сортів рослин: Закон України від 02.08.2006 № 60-V. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/60-16#Text> (дата звернення 15.05.2022)
- Регламент ради (ЄС) № 2100/94 від 27 липня 1994 року про права на сорти рослин Співтовариства. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/984_001-94#Text (дата звернення 15.05.2022)
- Схеми ОЕСР сортової сертифікації або контролю обігу насіння в міжнародній торгівлі. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/966_002#Text (дата звернення 15.05.2022)
- Cooperation between international organizations. URL: https://www.upov.int/meetings/en/doc_details.jsp?meeting_id=60594&doc_id=549292 (дата звернення 15.05.2022)
- Guidelines for control plot tests and field inspection of seed crops. 2019. 37 p. URL: <https://www.oecd.org/agriculture/seeds/documents/guidelines-control-plot-and-field-inspection.pdf> (дата звернення 18.06.2022)
- OECD Seed Schemes rules and regulations 2021. 179 p. URL: <https://www.oecd.org/agriculture/seeds/documents/oecd-seed-schemes-rules-and-regulations-2022.pdf> (дата звернення 18.06.2022)
- TG/1/3 General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized descriptions of new varieties of plants. URL: https://www.upov.int/export/sites/upov/resource/en/tg_1_3.pdf (дата звернення 18.06.2022)
- TGP/15 Guidance on the Use of Biochemical and Molecular Markers in the Examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS). URL: https://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_15.pdf (дата звернення 18.06.2022)
- UPOV/INF/18 Possible Use of Molecular Markers in the Examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS). URL: https://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov_inf_18.pdf (дата звернення 18.06.2022)

Частина 1.

Методики електрофорезу запасних білків насіння

- Аксенов И. В. Идентификация белковых спектров в гибридных комбинациях подсолнечника. Научно-технический бюллетень Института олійних культур УААН. 2009. № 14. С. 37.
- Заякина Г. В., Созинов А. Л. Идентификация нового зеинкодирующего локуса у кукурузы с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в кислой среде. Генетика. 1997. Т. 33, № 4. С. 489494.
- Ларченко К. А. Моргун Б. В. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення. Физиология и биохимия культурных растений. 2010. Т. 42, № 6. С. 463–474.
- Поморцев А. А., Лялина Е. В. Использование электрофоретического анализа запасных белков зерна в лабораторном контроле сортовых качеств семян. Вестник семеноводства в СНГ. 2000. № 4. С. 20–24.
- Попереля Ф. О. Генетична інтерпретація електрофореграм геліантиніну насіння F1 соняшнику. Цитология и генетика. 2000. Т. 34, № 2. С. 84–90.
- Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. С. 134–152.
- COU 74.3-37-357:2005. Визначення рівня гібридності (типівість) гібридів насіння соняшника методом електрофорезу
- Brzezinski W., Mendelewski P. Improved PAGE procedure for identification of wheat, triticale, barley and oat cultivars. [XII EUCARPIA Congr. (Febr. 28, 1989). Gottingen: Vortrage fur Pflanzenzuchtung]. 1989. P. 15.
- Brzezinski W., Van Gelder W.M.J., Mendelewski P., Kolster P. Polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadins: the use of moving boundary for improved resolution. Euphytica. 1989. No 40. P. 207212.
- Kozub N.O., Xynias I.N., Sozinov I.A. Diversity in seed storage proteins in substituted hexaploid triticale cultivars (4*Triticosecale* Wittmack). Cereal Research Communications. 2007. Vol. 35, No 3. P. 1469–1476. doi: 10.1556/CRC.35.2007.3.11
- Zayakina G. V., Sozinov A. L. 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.

Частина 2.

Методики дослідження з молекулярно-генетичного маркування та паспортизації рослин

- Бальвінська М.С., Сиволап Ю.М., Холявіцька І.Л. Використання фрагмент-аналізу для ДНК-типування сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.). Методичні рекомендації. Одеса, 2010. 18 с.
- Волкова Н. Е., Соколов В. М. Технологія генотипування KASPTM та її використання в генетико-селекційних програмах (на прикладі кукурудзи). Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2017. Т. 13, № 2. С. 131-140. doi: 10.21498/2518-1017.13.2.2017.105394
- Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армидиджа, Р. Уолдена. М.: Мир, 1991. 408 с.
- Джеймс Г., Уиттон Д., Хасти Т., Тибширани Р. Введение в статистическое обучение с примерами на языке R. Москва: ДМК Пресс, 2016. 460 с.
- Мастицкий С. Э., Шитиков В. К. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. М.: ДМК Пресс, 2015. 496 с.
- Методика проведення експертизи сортів рослин групи зернових на відмінність, однорідність і стабільність. URL: <https://sops.gov.ua/uploads/page/metodiki/2021-08-13-zernovy.pdf>
- Методика проведення експертизи сортів рослин групи олійних на відмінність, однорідність і стабільність. URL: https://sops.gov.ua/uploads/page/Meth_DUS/Method_oil2020.pdf
- Присяжнюк Л.М., Ткачик С.О., Шитикова Ю.В., Піскова О.В., Діхтяр І.О., Топчій О.В., Іваницька А.П., Ляшенко С.О., Чухлеб С.Л. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму сільськогосподарських культур за допомогою SSR маркерів. Методичні рекомендації. Вінниця; ФОП Корзун Д.Ю., 2019. 19 с.
- Шитиков В. К., Мастицкий С. Э. Классификация, регрессия и другие алгоритмы Data Mining с использованием R. 2017. 351 с.
- Beaubien K. A., Smith, K. P. New SSR markers for barley derived from the EST database. *Barley Genet. Newsl.* 2006. Vol. 36. P. 3043. doi: 10.1007/s00122-002-1031-0
- Brbaklić L., Trkulja D., Mikić S. et al. Genetic diversity and population structure of serbian barley (*Hordeum vulgare* L.) collection during a 40-year long breeding period. *Agronomy*. 2021. Vol. 11, No. 1. P. 118. doi: 10.3390/agronomy11010118
- Burstin J., Charcosset A. Relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigations. *Heredity*. 1997. Vol. 79, No 5. P. 477.
- Calistru A. E., Leonte C., Lăzărescu E., LIPȘA F. SSR markers associated with the resistance of rapeseed to the attack of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Lucrări Științifice, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" Iași, Seria Agronomie*. 2013. Vol. 56, No 2. P. 93–96.
- Chapter 8: Species and variety testing International rules for seed testing. 2017. Vol 2017, No 1. P. 1–32. doi: 10.15258/istarules.2017.08
- Chen Z., Tang D., Ni J. et al. Development of genic KASP SNP markers from RNA-Seq data for map-based cloning and marker-assisted selection in maize. *BMC Plant Biology*. 2021. Vol. 21, No 1. P. 111. doi: 10.1186/s12870-021-02932-8
- Cregan P. B., Akkaya M. S., Bhagwat A. A., Lavi U., Rongwen J. Length polymorphisms of simple sequence repeat (SSR) DNA as molecular markers in plants. *Plant genome analysis*. CRC Press, 2020. P. 4756.
- 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. *American Journal of Potato Research*. 2003. Vol. 90, No 4. P. 340–350. doi: 10.1007/s12230-013-9310-7
- Darvishzadeh R. Phenotypic and molecular marker distance as a tool for prediction of heterosis and F1 performance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Australian Journal of Crop Science*. 2012. Vol. 6, No 4. P. 732.
- Devaux C., Lavigne C., Falentin-Guyomarc'h H. et al. High diversity of oilseed rape pollen clouds over an agro-ecosystem indicates long-distance dispersal. 2005. Vol. 14, No 8. P 2269–2280. doi: 10.1111/j.1365-294x.2005.02554.x
- Dogan I., Dogan, Genetic N. Distance Measures: Review/Genetik Uzaklık Ölçüleri. *Türkiye Klinikleri Biyoistatistik*. 2016. Vol. 8, No 1. P.87. doi: 10.5336/biostatic.2015-49517
- Dutilleul P., Stockwell J. D., Frigon D., Legendre P. The Mantel test versus Pearson's correlation analysis: Assessment of the differences for biological and environmental studies. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*. 2000. P. 131150.
- El-Esawi M. A. Molecular genetic markers for assessing the genetic variation and relationships in *Lactuca* germplasm. *Annual Research & Review in Biology*. 2015. Vol. 8, No 5. P. 1-13. doi: 10.9734/ARRB/2015/20647
- Ertiro B. T., Ogugo V., Worku M., Das B. et al. Comparison of Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) and genotyping by sequencing (GBS) for quality control analysis in maize. *BMC genomics*. 2015. Vol. 16, No 1. P. 1-12. doi: 10.1186/s12864-015-2180-2
- Eujayl I., Sorrells M. E., Baum M. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002. Vol. 104, No 2. P.399–407. doi: 10.1007/s001220100738
- Fortin M. J., Dale M. R., Ver Hoef J. M. Spatial analysis in ecology. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. 2002. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118445112.stat07766.pub2/full>
- Ghislain M., Spooner D. M., Rodríguez F. et al. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. 2004. Vol. 108, No 5. P. 881–890. doi: 10.1007/s00122-003-1494-7
- Harmon L. J., Glor R. E. Poor statistical performance of the Mantel test in phylogenetic comparative analyses. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*. 2010. Vol. 64, No 7. P. 21732178. doi: 10.1111/j.1558-5646.2010.00973.x
- Hong J. H., Kwon Y. S., Mishra R. K., Kim D. H. Construction of EST-SSR databases for effective cultivar identification and their applicability to complement for lettuce (*Lactuca sativa* L.) distinctness test. *American Journal of Plant Sciences*. 2015. Vol. 6, Iss. 1. P. 113–125. doi: 10.4236/ajps.2015.61013
- Ipek M., Ipek A., Simon P. W. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2003. Vol. 128, No 2. P. 246252.
- Ipek M., Sahin N., Ipek, A. et al. Development and validation of new SSR markers from expressed regions in the garlic genome. *Scientia Agricola*. 2015. Vol. 72. P. 41–46. doi: 10.1590/0103-9016-2014-0138
- ISO/TR 17622:2015 Molecular biomarker analysis SSR analysis of sunflower

- ISO/TR 17623:2015 Molecular biomarker analysis SSR analysis of maize
- Jagtap A. B., Vikal Y., Johal G. S. Genome-wide development and validation of cost-effective KASP marker assays for genetic dissection of heat stress tolerance in maize //International journal of molecular sciences. 2020. Vol. 21, No 19. P. 7386. doi: 10.3390/ijms21197386
- James M Narvel, Walter R Fehr, Wen-Chy Chu et al. Simple Sequence Repeat Diversity among Soybean Plant Introductions and Elite Genotypes. *Crop Science*. 2000. Vol. 40, No 5. doi: 10.2135/cropsci2000.4051452x
- Karakousis A., Barr A. R., Chalmers K. J., *et al.* Potential of SSR markers for germ breeding and variety identification in Australian barley germplasm. *Australian journal of agricultural research*. 2003. Vol. 54, No. 12. P. 11971210. doi: 10.1071/AR02178
- Karakousis A., Gustafson J. P., Chalmers K. J. *et al.* A consensus map of barley integrating SSR, RFLP, and AFLP markers. *Australian Journal of Agricultural Research*. 2003. Vol. 54, No. 12. P. 11731185. doi: 10.1071/AR02177
- Karuri H. W., Ateka E. M., Amata R. *et al.* Evaluating diversity among Kenyan sweet potato genotypes using morphological and SSR markers. *Int. J. Agric. Biol.* 2010. Vol. 12, No 1. P. 3338.
- KASP. URL: <https://www.biosearchtech.com/products/pcr-reagents-kits-and-instruments/pcr-probes-and-assays/kasp-genotyping-panels/maize-genotyping-panel>
- Křístková E., Doležalová I., Lebeda A., Vinter V. et al. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Horticultural Science*. 2008. Vol. 35, No 3. P. 113129.
- Kujane K., Sedibe M. M., Mofokeng A. Genetic diversity analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes making use of SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*. 2019. Vol. 13, No 7. P. 1113–1119. doi: 10.21475/ajcs.19.13.07.p1638
- Kumar M., Rakesh Sharma V., Kumar V., Sirohi U. et al. Genetic diversity and population structure analysis of Indian garlic (*Allium sativum* L.) collection using SSR markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2019. Vol. 25, No 2. P. 377386. doi: 10.1007/s12298-018-0628-y
- Li L., Wanapu C., Huang X., Huang T. et al. Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of Brassica napus hybrids. *Journal of Agricultural Science*. 2011. Vol.101, No 3. doi: 10.5539/jas.v3n3p101
- Lowe A.J., Jones A.E., Raybould A.F. et al. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. 2022. Vol. 2, No 1. P. 7–11. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00126.x
- Madhumati B. Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*. 2014. Vol. 2, No1. P. 169–88.
- MAIZE UPOV Code: ZEAAA_MAY. Zea mays L. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. URL: <https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg002.pdf>
- Majeed U., Darwish E., Rehman S. U., Zhang X. Kompetitive allele specific PCR (KASP): a singleplex genotyping platform and its application. *Journal of Agricultural Science*. 2018. Vol. 11, No 1. P. 11. doi: 10.5539/jas.v11n1p11
- Malik M., Khan M. N. Analysis of Genetic Variations in Soybean using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Sarhad Journal of Agriculture*. 2021. Vol. 37, No 2. doi: 10.17582/journal.sja/2021/37.2.331.339
- Management of winter oilseed rape reference collections. Research program CPV5766, supported by the Community Plant Variety Office Research and Development Section, 1 January 2005 to 31 December 2007. URL: https://cpvo.europa.eu/sites/default/files/documents/techreports/Final_Report_Winter_Oil_Seed_Rape_Collection.pdf
- Márquez-Lema A., Velasco L., Pérez-Vich B. Transferability, amplification quality, and genome specificity of microsatellites in *Brassica carinata* and related species. 2010. Vol. 51, No 2. P. 123–131. doi:10.1007/bf03195720
- Mohamed A El-Esawi, Kieran Germaine, Paula Bourke, Renee Malone. Genetic diversity and population structure of Brassica oleracea germplasm in Ireland using SSR markers. *Comptes Rendus Biologies*. 2016. Vol. 339, No 3-4. P. 133–140. doi: 10.1016/j.crv.2016.02.002
- Mulato B. M., Müller, M., Zucchi, M. I. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2010. Vol. 45, No 3. P. 276–283. doi:10.1590/S0100-204X2010000300007
- Multinational Brassica Genome Project (MBGP). URL: <https://www.brassica.info/>
- Pagar T. A., Akhare A. A., Gahukar S. et al. DNA fingerprinting of soybean (*Glycine max* L.) genotypes by using simple sequence repeats (SSR) markers. *International Journal of Chemical Studies*. 2017. Vol. 5, No 5. P. 674–679.
- Patrícia Favoretto, Elizabeth Ann Veasey, Paulo César Tavares de Melo. Molecular characterization of potato cultivars using SSR markers. *Horticultura Brasileira*. 2011. Vol. 29, No 4. P. 542–547. doi:10.1590/S0102-05362011000400017
- Perry D. J. Identification of Canadian durum wheat varieties using a single PCR. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004. Vol. 109, No 1. P. 55–61. doi: 10.1007/s00122-004-1597-9
- R в действии. Анализ и визуализация данных в программе R / пер. С англ. Полины А. Волковой. М. ДМК Пресс, 2014. 588 с.
- Reid A., Hof L., Esselink D., Vosman B. Potato cultivar genome analysis. *Plant Pathology*. 2009. Humana Press, Totowa, NJ. P. 295–308.
- Řepková J., Dreiseitl A. Candidate markers for powdery mildew resistance genes from wild barley PI284752. *Euphytica*. 2010. Vol. 175, No 3. P. 283292. doi: 10.1007/s10681-009-0096-0
- Riday H., Brummer E. C., Campbell T. A. et al. Comparisons of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcata*. *Euphytica*. 2003. Vol. 131, No 1. P. 3745.
- Röder M. S., Korzun V., Wendehake K. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998. Vol. 149, No 4. P. 2007–2023. doi: 10.1093/genetics/149.4.2007
- Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular breeding*. 2014. Vol. 33, No 1. P. 1–14. doi: 10.1007/s11032-013-9917-x
- Semagn K., Beyene Y., Makumbi D. et al. Quality control genotyping for assessment of genetic identity and purity in diverse tropical maize inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012. Vol. 125, No 7. P. 1487-1501. doi: 10.1007/s00122-012-1928-1
- Simko I. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity*. 2009. Vol. 100, No 2. P. 256262. doi:10.1093/jhered/esn072
- SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. URL: https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/tg/tg_81_5_proj.pdf
- Szewc-McFadden A. K., Kresovich S., Bliet Mitchell S. M. et al. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species. 2006. Vol. 93, No 4. P. 534–538. doi: 10.1007/bf00417944
- Tommasini L., Batley J., Arnold G., Cooke R. et al. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003. Vol. 106, No 6. P. 1091–1101. doi: 10.1007/s00122-002-1125-8
- Turi N. A., Farhatullah R. M., Shinwari Z. K. Genetic diversity in the locally collected *Brassica* species of Pakistan based on microsatellite markers. *Pakistan Journal of Botany*. 2012. Vol. 44. P.1029–1035.
- Wang S., Wang B., Liu J., Ren J. et al. Novel polymorphic EST-based microsatellite markers characterized in lettuce (*Lactuca*

- sativa*). *Biologia*. 2017. Vol. 72, No 11. P. 13001305. doi: 10.1515/biolog-2017-0154
- Wizard® Magnetic 96 DNA Plant System. Technical bulletin. URL: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-magnetic-96-dna-plant-system-protocol.pdf?rev=0c73c6ac05ab4bc9a8b68f980aaf2e58&sc_lang=en
- Zhang X. X., Tang X. B., Liu Y., Zhang Y. W. Establishment and application of molecular ID in the main inbred lines of Chinese cabbage. *Genetics and Molecular Research: GMR*. 2017. Vol. 16, No 1. P. 112. doi: gmr16019144
- Zhou H., Zhang P., Luo J., Liu X. et al. The establishment of a DNA fingerprinting database for 73 varieties of *Lactuca sativa capitata* L. using SSR molecular markers. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2019. Vol. 60, No 1. P. 95103. doi: 10.1007/s13580-018-0102-3

Додаток 1

до Збірника методик

«Методи молекулярно-генетичного аналізу для застосування у кваліфікаційній експертизі на ВОС»

Таблиця 1. Характеристики праймерів SSR маркерів кукурудзи звичайної та діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	umc1147	GAGAAACCATCGACCCTTCCТААC	TTCTATGGTACAGTTCCTCCCTCG	4	61–86
2	phi109275	CGTTTCATGCTAGCTCTGC	GTTGTGGCTGTGGTGGTG	6	121–137
3	phi427913	CAAAAGCTAGTCGGGGTCA	ATTGTTCGATGACACACTACGC	5	119–133
4	umc1885	TATACCAGCATCAGGTCGTCG	GTAGAGTGACCGTGTGTAGCAGA	3	136–142
5	phi064	CCGAATTGAATAGCTGCGAGAACCT	ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC	8	75–110
6	phi96100	AGGAGGACCCCAACTCTG	TTGCACGAGCCATCGTAT	4	275–294
7	phi083	CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC	ATTCATCGACGCGTACAGTCTACT	6	123–136
8	umc1448	ATCCTCTCATCTTAGGTCCACCG	CATATACAGTCTCTTCTGGCTGCTCA	5	137–161
9	phi102228	ATTCGACGCAATCAACA	TTCATCTCTCCAGGAGCCTT	6	122–133
10	umc1489	TTAATAGCTACCCGCAACCAAGAA	CTGAGCCACAGTACCTTGCTGTT	4	123–135
11	umc1117	AATTCTAGTCCTGGGTCGGAATC	CGTGGCCGTGGAGTCTACTACT	3	122–135
12	umc1329	CCTCTCACATCTCTCTCCCT	GTGTCGGTGTAGGTCTCCGCTT	4	74–92
13	phi093	AGTGGCTCAGTTCATCGCCTACAAG	AGGCCATGCTGTTGCAACAATGGATAACA	7	281–294
14	umc1180	GAAGCCCTTGAATGAATGAAC	CGACGTACGTATAGACTCGCTCAG	2	99–102
15	nc130	GCACATGAAGATCCTGCTGA	TGTGGATGACGGTGTATGC	5	139–148
16	umc1478	GAAGTCTCTCTCTCGCGTCTC	CAGTCCCAGACCCTAGCTCAGTC	4	134–144
17	umc1792	CATGGGACAGCAAGAGACACAG	ACCTTCATCACCTGCAACTACGAC	5	115–134
18	umc1153	CAGCATCTATAGCTTGTGCTTGCATT	TGGGTTTTGTTTGTGTTGTTGTTG	5	101–113
19	umc1143	GACTAGCAATGTTCAAAAACCC	CGTGGTGGGATGCTATCCTTT	5	71–82
20	phi423796	CACTACTCGATCTGAACCACCA	CGCTCTGTGAATTTGCTAGCTC	5	125–137
21	umc1133	ATTCGATCTAGGGTTTGGGTTTCAG	GATGCAGTAGCATGCTGGATGTAG	3	91–105
22	phi123	GGAGACGAGGTGCTACTTCTTCAA	TGTGGCTGAGGCTAGGAATCTC	4	141–147
23	phi089	GAATTGGGAACCAAGACCCCAA	ATTTCCATGACCATGCCTCGTG	4	81–91
24	umc1545	GAAAACATCAGCAACAACAAGCTG	ATTGGTTGGTCTTGCTTCCATTA	6	70–85
25	umc1134	AAAACCTAACAGGCAGCAGACCAAC	ATCAGCAAGTGACTGAATTCCTCC	4	75–88
26	phi116	GCATACGGCCATGGATGGGA	TCCCTGCCGGGACTCCTG	4	152–173
27	umc1304	CATGCAGTCTCCAAATTAATCC	GCCAACTAGAACTACTGTGCTCC	2	131–136
28	phi233376	CCGGCAGTCGATTACTCC	CGAGACCAAGAGAACCCTCA	6	140–159
29	bnlg1782	CGATGCTCCGCTAGGAATAG	TGTGTTGAAATTGACCCAA	7	219–236
30	phi015	GCAACGTACCGTACCTTTCCGA	ACGCTGCATTCAATTACCGGGAAG	7	82–103
31	phi032	CTCCAGCAAGTGATGCGTGAC	GACACCCGGATCAATGATGGAAC	3	232–239
32	bnlg1129	GAGAGTATGCTACTCGCCGC	GACGAGTTTGGAGTGCCATT	5	179–202
33	umc1319	TGAGAGCCACCTTCTTGAGCTACT	TTCCTTGAAGGCGAAGGTAGGTAT	4	115–124
34	phi050	TAACATGCCAGACACATACGGACAG	ATGGCTTAGCGAAGCGTAGAG	3	82–88
35	phi084	AGAAGGAATCCGATCCATCCAAGC	CACCCGTAATTGAGGAAAACCC	2	154–157
36	umc1061	AGCAGGAGTACCCATGAAAGTCC	TATCACAGCACGAAGCGATAGATG	8	97–107

*Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Таблиця 2. Характеристики праймерів SSR маркерів пшениці та діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	DuPw167	CGGAGCAAGGACGATAGG	CACCACCAACATCAGGAACC	9	244–266
2	DuPw217	CGAATTACACTTCTTCTCCG	CGAGCGTGTCTAACAAGTGC	5	227–241
3	DuPw004	GGTCTGGTCCGAGAAGAAGC	TGGGAGCGTACGTTGTATCC	4	213–310
4	DuPw115	TGTTTCTTCTCGCGTAACC	CCTCGAATCTCCAGTTATCG	3	202–208
5	DuPw205	ATCCAGATCACACCAACCGG	CTTCCGCTTCATCTTCTGTC	2	183–193
6	Xgwm155	CAATCATTCCCTCCCTCC	AATCATTGGAATCCATATGCC	8	144–172

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
7	Xgwm413	TGCTTGCTAGATTGCTTGGG	GATCGTCTCGTCCTTGGCA	10	106-128
8	Xgwm003	GCAGCGCACTGGTACATTT	AATATCGCATCACTATCCCA	5	94-102
9	Xgwm372	AATAGAGCCCTGGGACTGGG	GAAGGACGACATCCACCTG	9	304-352
10	Xbarc347	GCGCACCTCTCCTCACCTTCT	GCGAACATGGAAATGAAAACATCT	6	247-258
11	Xbarc184	TTCCGGTATATCTTTCCCTTGA	CCGAGTTGACTGTGTGGCTTGCTG	5	211-235
12	Xbarc074	GCGCTTGGCCCTTCAGGCGAG	CGCGGGAGAACCACCAGTGACAGAGC	9	183-203
13	Xgwm052	CTATGAGCGGAGGTTGAAG	TGCGGTGCTCTTCCATTT	3	164-171
14	Xgwm095	GATCAAACACACACCCCTCC	AATGCAAAGTGAAAAACCCG	4	127-141

Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Таблиця 3. Характеристики праймерів SSR маркерів ячменю та діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	EBmac501	ACTTAAGTGCCATGCAAAAG	AGGGACAAAAATGGCTAAG	13	124-164
2	Bmag225	AACACACCAAAAATATTACATCA	CGAGTAGTTCCTCATGTGAC	9	136-162
3	Bmac96	GCTATGGCGTACTATGTATGGTTG	TCACGATGAGGTATGATCAAGA	11	152-186
4	EBmac874	AACATTCTCACCAGG	GTGAATGATGTTGAGGACATTG	11	170-204
5	EBmac602	GATTGGAGCTTCGGATCAC	CCGTCTAGGGAGAGGTTCTC	13	134-172
6	Bmag321	ATTATCTCTGCAACAACCTA	CTCCGGAACACGACAAG	10	208-230
7	Bmag120	ATTTATCCCAAAGGAGAC	GTCACATAGACAGTTGTCTTCC	8	226-260
8	AWBMS56	GGAGATTGTGGCTGCTGCTTTG	GGCGACGGGTAGCTGTATTTG	10	216-262
9	Bmac93	CGTTTGGGACGTATCAAT	GGGAGTCTTGAGCTACTG	6	150-160
10	Bmag603	ATACCATGATACATCACATCG	GGGGTATGTACGACTAACTA	5	112-152
11	EBmac701	ATGATGAGAATCTTCACCC	TGGCACTAAAGCAAAGAC	9	132-148
12	Bmac310	CTACCTCTGAGATATCATGCC	ATCTAGTGTGTGTGCTTCTC	13	136-199
13	Bmag341	TCATGGAGACCGTTGTAGT	CCACAAGCCTCTGTTCTC	10	204-228
14	UMB503	TCCCGGTGCCATATACAAAT	TTTGATGAAACGAAGGGAAA	12	121-168
15	HVM68	AGGACCGGATGTTCATAACG	CAAATCTCCAGCGAGGCT	5	186-214

Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Таблиця 4. Характеристики праймерів SSR маркерів соняшнику однорічного та діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	ORS309	CATTTGGATGGAGCCACTTT	GATGAAGATGGGGAATTTGTG	2	121131
2	SSL003	CACAACCTTTCTTCTGCTTCC	GAGTCTCATTTGAGCCCACC	6	118142
3	ORS342	TGTTTCATCAGGTTTGTCTCCA	CACCAGCATAGCCATTCAAA	5	307345
4	ORS547	TTGTCTTCATCTGCGTGTGA	TTGCTGTTGTGATCGGTGT	7	178191
5	ORS613	GTA AACCTAGGTC AATTTGCAG	ATCTCCGGAAAACATTCTCG	8	201230
6	SSL171	TCTGAACTGGAGGATGGGAC	TGCAAAGAAGAAGAAGTGGAGA	6	129162
7	ORS432	TGGACCAGTCGTAATCTTTGC	AAACGCATGCAAATGAGGAT	3	160164
8	ORS510	CATCGCGTCCCTCTCTAA	CCAACCATCACAGCAATCAG	3	248259
9	ORS605	CGCGTGATGTGACGATTATT	ACGGAGCAAAGTTTCGAGGT	8	174203
10	ORS329	CATCCTCTCACCAACCAGA	GGGAAATCTTAAACGGTATGG	2	231236
11	ORS621	CGCCTATGCTGAGAGGAAA	CCTGAAGCGAAGAAGAATCG	7	232250
12	SSL283	TTCCAGTTGATTCCTTTG	GAGCATTGGAGGCCAATAAG	4	130141
13	ORS307	CAGTCCCTGAAACCAATTCA	GCAGTAGAAGATGACGGGATG	4	109137
14	ORS811	CCTTCTCTCAATCTTTGGCTA	AGGAATGAAATGGGTGTGTGT	3	106155
15	ORS502	ATCCCAACAGACGCCATTAT	AACATTGGAGGGAGCCAATA	5	92165
16	ORS407	TGGCTAGGATTGCTTCATCA	TTTGCTTGCCTTCTTACCT	4	426447

*Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Таблиця 5. Характеристики праймерів SSR маркерів ріпаку озимого та ярого і діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	Ra2-E03	AGGTAGGCCCATCTCTCC	CCAAAAGTGTCTAAAACCC	3	110-245
2	BN12A	GCCGTTCTAGGGTTTGTGGGA	GAGGAAGTGAGAGCGGGAAATCA	2	251285
3	BN26A	TAAACTTGTACAGACGCCGTTATC	CCCGTAAATCAAGCAAATGG	1	90120
4	CLONE33	GTTTGTGTGCAATTATTCCCA	CCTGCATTGCGAAAATATAATC	3	135250
5	LS107	GTTAAGTGTGGCGTTAGAGG	CCTTGGTACATGCCACTGAA	3	100367
6	MB5	AACATCTTTTTCGCGTATAT	AATAGCATTGAAGCCTTAC	2	200-400
7	Na10-H03	GAGCTGGCTCATTCAACTCC	CACAATTTCTCAGACAAAACGG	2	100-150
8	Na10-E02	TCGCGCATGTAATCAAAAATC	TGTGACGCATCCGATCATA	3	115-135
9	Na12-D04	ACGGAGTGATGATGGGTCTC	CCTCAATGAAAAGTAAAATATGTGTG	1	280
10	Na12-A02	AGCCTTGTGTCTTTTCAACG	AGTGAATCGATGATCTCGCC	5	158194
11	Na12-E02	TTGAAGTAGTTGGAGTAATTGGAGG	CAGCAGCCACAACCTTACG	4	89119
12	Na14-H11	GGATGTTTTTCACAGACCCCTG	CTTTGCAAGTATGAACACGC	4	108-120
13	OL09-A06	TGTGTGAAAGCTTGAAACAG	TAGGATTTTTTGTTCACCG	3	110-112
14	OL10-B01	CCTCTCAGTCGAGGTCTGG	AATTTGAAACAGAGTCGCC	4	150-180
15	OL10-BF11	TTTGAACGTCCTGTAAGG	CAGCTGACTTCGAAAGGTCC	2	145-190
16	OL11-B05	TCGCGACGTTGTTTTGTTT	ACCATCTTCCTCGACCCTG	3	140160
17	OL11-G11	GTTGCGGCGAAACAGAGAAG	GAGTAGGCGATCAAACCGAG	3	70200
18	OL12-F02	GGCCCATGATATGGAGATG	CATTCTCAATGATGAATAGT	4	110139
19	OL13-C12	AGAGGCCAACAAAGAACACC	GAAGCAGCACCAGTGACAAG	3	84-196
20	Ra1-F06	ACCAAATGTGTGAAGCCAC	CTTGTGGCCAGATTCATCAC	6	205260
21	Ra2-A05	GCTAGTTACGGGGCGG	AAACGACATCGGCAAGAAG	2	180230
22	Ra2-A11	GACCTATTTAATATGCTGTTTTACG	ACCTCACCGGAGAGAAAATCC	4	220-300
23	Ra2-E11	GGAGCCAGGAGAGAAGAAGG	CCCAAAAATCTCAAGAAAAGC	6	74-208
24	Ra3-H09	GTGGTAACGACGGTCCATTC	ACCACGACGAAGACTCATCC	9	146154
25	FIT0-063	GTTTCAGTTCACAGATTCCTAA	TTTCTCTCTCTCTCTCTCTC	5	267700
26	Na10-B07	GCCTTAGATTAGATGGTCGCC	ACTTCAGCTCCGATTTGCC	3	104161
27	FIT0-136	CCTCCTCCTCAGACTTACACT	TCACATCCACCATAACCTTT	4	130133
28	Na10-B11	TTTAAACAACAACCGTCACGC	CTCCTCCTCCATCAATCTGC	4	200-240
29	Na14-H12	CACATTTGGCAGTATCCATC	GGCTGATCGAACACAAATAAG	1	207

*Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Таблиця 6. Характеристики праймерів SSR маркерів сої культурної та діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	Satt114	GGGTTATCCTCCCAATA	ATATGGGATGATAAGGTGAAA	10	75-130
2	Satt063	AAATGATTAACAATGTTTATGAT	ACTTGCATCAGTTAATAACAA	15	95-210
3	Satt228	TCATAACGTAAGAGATGTA AAAACT	CATTATAAGAAAACGTGCTAAAGAG	18	200-270
4	Satt726	GCGTTTTTAGTATGGATAATGTTTT	GCGAAGGGACAAGAGTGAT	17	170-280
5	Satt001	AAAGTCTTTAAAAGTGTCTTA	TAAAAGAAAAATGCAACAT	10	103200
6	Satt009	CCAACTGAAATTAAGTAGAGAAA	CTTACTAGCGTATTAACCTT	6	8693
7	Satt191	CGCGATCATGCTCTG	GGGAGTTGGTGTCTTCTGTG	10	212258
8	Satt192	CACCGTGATTAAGATTTTT	CGCTGAGTTGTTTTCATC	11	204280

*Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Таблиця 7. Характеристики праймерів SSR маркерів картоплі та діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	STM0019	AATAGGTGTAAGTCTCAATG	GTTTGAAGTAAAAGTCTAGTATGTG	10	160240
2	STM2005	TTTAAGTTCTCAGTTCTGCAGGG	GTTTGTCTAACCCTTACCATTGCTGGG	6	135180
3	STM2028	TCTCACCAGCCGGAACAT	GTTTAAAGCTGCGGAAGTGTATTTG	9	195230
4	STM3009	TCAGCTGAACGACCACTGTTC	GTTTGATTTTACCAAGCATGGAAGTC	13	145200
5	STM3012	CAACTCAAACCAGAAGGCAAAA	GTTTGAGAAATGGGCACAAAAACA	7	160220
6	STM3023	AAGCTGTTACTTGATTGCTGCA	GTTCTGGCATTTCCATCTAGAGA	4	170205
7	STM5136	GGGAAAAGGAAAAGCTCAA	GTTTATATGAACCACCTCAGGCAC	10	180415
8	STM5148	TCTTCTTGATGACAGCTTCG	GTTTACCTCAGATAGTTGCCATGTCA	18	210255
9	SSR1	GATGAGATGAGATATGAAACAACG	GTTTCGCAATCTCTTGACAGTGTCACTGAAAC	14	400485

Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Таблиця 8. Характеристики праймерів EST-SSR маркерів часнику та діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	AS2655	AACTCAATGCATGACAGAAGG	AGGAGGAGGAGAATGCTGAA	5	242-262
2	AS211	AGAACATGAACCGGGATAGA	GAGGTTGCTGTTGCTGC	4	146-164
3	AS5944	AGAGGGTTTTTCGATCTGGA	AGTGGCATCAAAGCAAGATG	12	177-243
4	AS11065	AACAGTCGAAAGCGTGGATTG	TACGGCTTGCTACCAAAGAC	11	189-219
5	AS987	GTACCAACTCTTTCCTAACGC	TCCAATAGTTGTGATGACAGG	5	216-231
6	AS96	TCTTACCCCTTCAACAACAG	AGTAATCGGAGGTCGAAGTTG	4	130-148
7	AS449	CTCTCTATTTTGCACACCGT	AAGCTCCCATCTTCATCTC	4	198-215
8	AS437	TCGTCTGGCGTTGCATTATC	CGCTTGAATCGTTGATGACG	4	332-341
9	AS653	CACGTCAACTTTTCTTCGTTT	TCATAAATCAAAGCTCACAAAG	4	140-146
10	AS739	AACAGGGATCTTTCCTCAGC	GATCTGTTGTTGGTTGATGTTT	7	201-227

Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Таблиця 9. Характеристики праймерів EST-SSR маркерів салату посівного та діапазон розмірів ампліконів

№ з/п	Назва маркера	Нуклеотидна послідовність прямого праймера 5'...3'	Нуклеотидна послідовність зворотного праймера 5'...3'	Кількість ампліконів, шт.	Діапазон розмірів ампліконів, п.н.*
1	KSL-26	GGGCTTCTCTCCTTTCCTTT	AATTTGGATCCTGTCGAGGG	8	300-319
2	KSL-32	CGGGGAGCATTTAGTGTGTG	AATTTGGGGTCCGATTTGAG	5	210-218
3	KSL-37	TCTTCTGCTCCAATACCCGA	GTATCGGGCTCATGTCCCTT	6	125-155
4	KSL-92	GGTCTCTTCTCTGCCCTG	TCGCGTTCTGAAGTAGCCAT	5	188-196
5	KSL-119	TTCGACTCGTCTTCGACGC	CGATGTCACACCACCCATCT	4	271-279 4
6	KSL-173	ATAGTCACGACTCACGCCCA	CCATTTCTCTTTCTGCGA	4	155-165 4
7	KSL-271	ACAAAGGCAAGATTGGGTCA	GCGGATATGCAGCCATAACA	3	238-250

Примітка: кількість і діапазон розмірів ампліконів визначено на основі аналізу літературних джерел

Науково-практичне видання

**МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ОЦІНКИ СОРТІВ РОСЛИН
НА ВОС ТА СОРТОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ**

Методичні рекомендації

Методичні рекомендації підготували: Л. М. Присяжнюк, С. М. Гринів, С. І. Мельник, Ю. В. Шитікова,
І. О. Діхтяр, М. М. Таганцова, Український інститут експертизи сортів рослин, 2023

Рецензенти: Кляченко О. Л., доктор с.-г. наук, професор, Національний університет біоресурсів
і природокористування України
Карпук Л. М., доктор с.-г. наук, професор, Білоцерківський національний аграрний університет

Комп'ютерне верстання: Бойко А. І.

Формат 60×84 1/8. Папір офсетний.
Друк офсетний. Гарнітура SchoolBook
Умов. друк. арк. 5,0 Обл.-вид. арк. 3,5
Тираж 50 прим. Зам. № 2427/1

Віддруковано з оригіналів замовника.

Видавець та виготовлювач 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.

21034, м. Вінниця, вул. Немирівське шосе, 62а.
Тел.: 0 (800) 33-00-90, (096) 97-30-934, (093) 89-13-852, (098) 46-98-043.
e-mail: info@tvoru.com.ua
<http://www.tvoru.com.ua>

