

**ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ,
ІДЕНТИФІКАЦІЯ, ВИЗНАЧЕННЯ
ТИПОВОСТІ ТА ГІБРИДНОСТІ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР
ЗА ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯМ**

Методичні рекомендації

Національна академія аграрних наук України
Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

**ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ,
ІДЕНТИФІКАЦІЯ, ВИЗНАЧЕННЯ
ТИПОВОСТІ ТА ГІБРИДНОСТІ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР
ЗА ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯМ**

Методичні рекомендації

Одеса
СГІ — НЦНС
2015

Друкується за рішенням вченої ради Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (протокол № 10 від 18.12.2015 р.)

Обґрунтовані принципи та вимоги щодо визначення генетичної однорідності сортів, ліній пшениці, ячменю, кукурудзи, сояшнику, а також генетичної чистоти й рівня гібридності насіння першого покоління простих гібридів кукурудзи, сояшнику, ідентифікації та реєстрації зразків за ДНК-профілюванням.

Міститься інформація щодо підготовки та виконання молекулярно-генетичних досліджень рослинного матеріалу: виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції з мікросателітними маркерами, гель-електрофорезу, інтерпретації результатів аналізу.

Призначені для науковців та фахівців у галузі селекції, насіннезнавства, генетики, біотехнології.

Автори:

Бальвінська М. С., к. б. н., ст. наук. співроб.;

Волкова Н. Е., д. б. н., ст. наук. співроб., голов. наук. співроб.;

Колесник О. О., к. б. н., молод. наук. співроб.;

Солоденко А. Є., к. б. н., ст. наук. співроб., провід. наук. співроб.;

Чеботар С. В., д. б. н., ст. наук. співроб., провід. наук. співроб., зав. кафедри генетики та молек. біології ОНУ, чл.-кор. НААН України

Рецензенти:

Молодченкова О. О., д. б. н., с. н. с.;

Мулюкіна Н. А., д. с.-г. н., с. н. с.

Відповідальний за випуск: в. о. директора СГІ — НЦНС, чл.-кор. НААН *Соколов В. М.*

<i>Вступ</i>	5
1. ОБЛАДНАННЯ ТА ВИТРАТНІ МАТЕРІАЛИ	8
2. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ	9
3. ЕТАПИ ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯ	
3.1. Відбір проб	13
3.2. Виділення ДНК	13
3.2.1. Підготовка до виділення ДНК	13
3.2.2. Процедура виділення та очищення ДНК	14
3.3. Визначення концентрації ДНК	14
3.4. Зберігання проб	15
3.5. Вимоги щодо безпеки	15
4. ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯ	
4.1. Проведення полімеразної ланцюгової реакції	16
4.2. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації	17
4.3. Візуалізація продуктів ампліфікації	17
4.4. Документування результатів	18
4.5. Фрагмент-аналіз із застосуванням автоматичної системи детекції	18
4.5.1. Процедура підготовки і хід аналізу	20
4.5.2. Приготування зразків для нанесення	21
4.5.3. Електрофорез у системі ALFexpress II	21
4.5.4. Візуалізація й обробка даних	23
4.5.5. Рекомендації щодо безпеки роботи	23
5. НАПРЯМИ АНАЛІЗУ ЗА ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯМ	
5.1. Диференціація зразків на прикладі сортів пшениці м'якої озимої	24
5.1.1. Схема диференціації	25
5.2. Визначення генетичної чистоти	26

5.3. Визначення рівня гібридності насіння простих гібридів першого покоління кукурудзи та соняшнику	28
5.3.1. Порядок визначення	29
5.3.2. Реєстрація та оформлення результатів	29
5.3.3. Контролювання результатів	29
5.4. Реєстрація та ідентифікація зразків на прикладі ліній та гібридів кукурудзи	30
5.4.1. Опрацювання результатів	30
<i>Список використаної літератури</i>	<i>33</i>
<i>Додаток</i>	<i>37</i>

Сорти рослин є матеріальним та інтелектуальним надбанням України. Вони використовуються у селекційному процесі та формуванні національних сортових ресурсів, які забезпечують стабілізацію й збільшення обсягів виробництва продукції рослинництва, що складає основу продовольчої безпеки держави.

Україна є членом Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин (Union pour la Protection des Obtentions Végétales, UPOV). Мета конвенції UPOV — забезпечення визнання державами-членами Союзу нових сортів рослин шляхом надання на них виключного права власності. Як член UPOV, держава бере на себе зобов'язання охороняти права селекціонерів на основі принципів, які отримали міжнародне визнання і підтримку [1–3]. Експертна оцінка для державної реєстрації сортів та прав на них здійснюється при проведенні експертизи з визначення критеріїв охороноздатності (ВОС-тест: відмінність, однорідність, стабільність) [4; 5]. ВОС-тест — морфописовий метод, який охоплює певний набір якісних та кількісних ознак. Його застосовують з метою створення кодових формул сортів. Ідентифікація формул кодів сортів даного виду дозволяє зробити висновок про відмінність чи схожість сорту, який проходить експертизу, від визнаного сортового генофонду країни [6].

Задля використання молекулярних маркерів у системі реєстрації нових сортів рослин в UPOV створено робочу групу з аналізу біохімічних і молекулярних методів ДНК-профілювання, яка рекомендувала [7] впровадити молекулярні методи у процедуру виявлення відмінностей між сортами-кандидатами. Застосування молекулярних маркерів є одним з найефективніших методів ДНК-профілювання генотипів рослин, оцінки їх генетичного різноманіття та спорідненості між ними [8]. Так, на 44 сесії UPOV (21 жовтня 2010 року) головними критеріями придатності молекулярних методів для диференціації сортів були визначені: відтворюваність результатів між лабораторіями за умов ідентичності видів обладнання, на якому здійснюються аналізи; дискримінаційна сила; можливості для створення бази даних; доступність методології [9]. Широко обговорюються проблеми вдосконалення технологій та застосування нового обладнання в тому сенсі, щоб дані, отримані різними методами, узгоджувалися між собою.

За критеріями повторюваності та відтворюваності показана доречність використання технології мікросателітного (МС) аналізу, тобто аналізу простих послідовностей, що повторюються у геномі (Simple sequence repeat, SSR), та в майбутньому — аналізу поліморфізму одонуклеотидних замін (Single nucleotide polymorphism, SNP) [9].

На 45 сесії UPOV (20 жовтня 2011 року) запропоновано [7; 9] використання молекулярних маркерів, а саме рекомендованого набору з восьми МС-маркерів для диференціації сортів пшениці. Також UPOV обговорені можливості використання молекулярних геноспецифічних маркерів, що пов'язані з традиційними фенотиповими ознаками рослин, які складно візуально оцінювати в полі, тобто їх оцінка потребує додаткових спеціальних заходів (наприклад, ознаки стійкості до хвороб). Зокрема запропоновано пари сортів, які не відрізняються за фенотиповими ознаками, розглядати на відмінність за молекулярними маркерами [7].

Свого часу в практику офіційної ідентифікації сортів пшениці СРСР були впроваджені білкові маркери, а саме клейковинні білки гліадин та глютенін (*Gli* та *Glu*) [10], які також рекомендував UPOV [11]. Слід зазначити, що ці білкові маркери суттєво поступаються МС-маркерам за роздільною здатністю. Так, у роботі [12] із 75 сортів 16 не були ідентифіковані однозначно, при тому що аналіз базувався на 10 локусах.

Отже, застосування МС-маркерів для диференціації, а також контролю генетичної чистоти насіння додасть надійності у правовому захисті сучасних українських сортів як в Україні, так і за кордоном.

Генетично однорідний матеріал є основою отримання високоякісного насіння будь-якої цінної рослинної культури. Проведення ДНК-профілювання надасть змогу ефективно оцінити генетичну чистоту матеріалу для отримання конкурентоспроможних на світовому ринку сортів пшениці та ячменю, ліній і гібридів кукурудзи та соняшнику.

Слід підкреслити, що отримання насіння гібридів першого покоління з високим рівнем гібридності забезпечує прояв ефекту гетерозису та значну врожайність кукурудзи й соняшнику. Нами рекомендовано застосування ДНК-профілювання для визначення рівня гібридності насіння простих гібридів першого покоління. Це дозволить скоротити термін оцінювання та підвищити точність визначення рівня гібридності.

Мета даної роботи — надання рекомендацій щодо диференціації, визначення однорідності, типовості, гібридності, ідентифікації та

реєстрації сортів пшениці, ячменю, гібридів кукурудзи, сояшнику застосуванням МС-аналізу за апробованими молекулярними маркерами.

Надана також інформація стосовно обладнання для ДНК-профілювання, наведено перелік хімічних реактивів та розчинів для обраного типу досліджень, методики виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції із МС-маркерами; візуалізації продуктів ампліфікації за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі.

У методичних рекомендаціях надані:

- вимоги до методів визначення ідентичності чи відмінності сортів, генетичної чистоти сортів, ліній, гібридів, рівня гібридності насіння першого покоління простих гібридів кукурудзи та сояшнику, а також ідентифікації сортів за ДНК-профілюванням;
 - вимоги до добору проб, підготовки приміщень та посуду;
 - засоби і пристрої для ДНК-профілювання;
 - приготування розчинів необхідних реактивів;
 - процедури виділення рослинної ДНК, визначення її концентрації, проведення полімеразної ланцюгової реакції із використанням пар праймерів до МС-локусів та електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації;
 - документування та форма реєстрації і оформлення результатів ДНК-профілювання;
 - вимоги щодо безпеки при ДНК-профілюванні.
- Застосування методичних рекомендацій забезпечить можливість:
- диференціації, тобто виявлення відмінності сортів, ліній, гібридів пшениці, ячменю, кукурудзи, сояшнику;
 - контролювання генетичної чистоти сортів, ліній, гібридів пшениці, ячменю, кукурудзи, сояшнику;
 - тестування рівня гібридності насіння першого покоління простих гібридів кукурудзи, сояшнику в процесі насінництва та насінневого контролю;
 - ідентифікації генотипів сортів, ліній, гібридів пшениці, ячменю, кукурудзи, сояшнику за ДНК-профілем.

1. ОБЛАДНАННЯ ТА ВИТРАТНІ МАТЕРІАЛИ

ДНК-профілювання сільськогосподарських культур потребує застосування такого обладнання та витратних матеріалів (за абеткою):

– аналізатор ДНК, наприклад, ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech, Швеція);

– баня водяна;

– бокс ламінарний для стерильних робіт з горизонтальним потоком повітря;

– ваги лабораторні, найбільша межа зважування 0,5 кг, клас точності I;

– джерело постійного струму з напругою 150–600 В;

– дозатори автоматичні змінного об'єму;

– змішувач вортекс для струшування і перемішування суміші в мікропробірках, з циркуляційно-вібраційним рухом до 2400 об./хв;

– мікропробірки поліпропіленові місткістю 0,2, 0,5, 1,5 мл (або планшети);

– мікроцентрифуга для пробірок або планшетів, 14000 об./хв;

– мішалка лабораторна електромагнітна з підігрівом;

– набір для вертикального електрофорезу;

– наконечники поліпропіленові для дозаторів змінного об'єму;

– система відеодокументування електрофореграм з програмним забезпеченням;

– термостат;

– термоциклер;

– УФ-бокс для полімеризації поліакріламідних гелів, які використовуються в аналізаторі ДНК, наприклад, ReproSet™ (Amersham Pharmacia Biotech, Швеція);

– флуорометр;

– шафа витяжна;

– рН-метр.

2. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ

Розчин цетилтриетиламонію бромиду (ЦТАБ) з масовою часткою 10 %
Наважку ЦТАБ масою 100 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють у 900 мл бідистильованої води. Розчин збовтують на електромагнітній мішалці з підігрівом за температури не більше 68 °С до повного розчинення препарату. За допомогою концентрованої соляної кислоти та рН-метра встановлюють рН 7,2 та доводять бідистильованою водою до мітки.

Розчин натрію хлористого з молярною концентрацією 5 моль/л
Наважку натрію хлористого масою 292,2 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють у 900 мл бідистильованої води. Розчин збовтують на електромагнітній мішалці до повного розчинення препарату та доводять бідистильованою водою до мітки.

Розчин трису з молярною концентрацією 1 моль/л, рН 7,5
Наважку трису масою 121,1 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють у 750 мл бідистильованої води. Доводять рН до необхідного значення (рН 7,5) додаванням концентрованої соляної кислоти. Кількість концентрованої соляної кислоти складає приблизно 70 мл. Остаточо доводять рН за допомогою рН-метра після охолодження розчину до кімнатної температури (20 °С), потім додають бідистильовану воду до мітки.

Розчин трису з молярною концентрацією 1 моль/л, рН 8,5
Наважку трису масою 121,1 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють у 750 мл бідистильованої води. Доводять рН до необхідного значення (рН 8,5) додаванням концентрованої соляної кислоти. Кількість концентрованої соляної кислоти складає приблизно 40 мл. Остаточо доводять рН до заданого показника рН-метром після охолодження розчину до кімнатної температури (20 °С), потім додають бідистильовану воду до мітки.

Розчин Трилону Б (ЕДТА, динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) з молярною концентрацією 0,5 моль/л

Наважку Трилону Б масою 186,12 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють у 750 мл бідистильованої води, інтенсивно перемішують на електромагнітній мішалці. Доводять рН до

8,0 додаванням NaOH з масовою часткою 98,5 % (приблизно 40 г). Доводять показник рН до потрібного рН-метром, після чого додають бідистильовану воду до мітки.

Розчин ЦТАБ (лізуючий)

До мірної колби місткістю 200 мл додають 40 мл розчину ЦТАБ з масовою часткою 10 %, 56 мл розчину натрію хлористого з молярною концентрацією 5 моль/л, 0,2 мл розчину трису з молярною концентрацією 1 моль/л, рН 8,5, 8 мл розчину Трилону Б з молярною концентрацією 0,5 моль/л, бідистильованої води до мітки, ретельно перемішують.

Розчин протеінази К з масовою часткою 20 мг/мл

Наважку протеінази К масою 200 мг засипають до мірної колби місткістю 10 мл і доводять до мітки бідистильованою водою, ретельно перемішують до повного розчинення препарату. Готовий розчин зберігають у холодильнику за мінус 20 °С не більше 6 місяців.

Суміш хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1)

До мірної колби місткістю 250 мл заливають 240 мл хлороформу та 10 мл ізоамілового спирту, добре перемішують. Готову суміш зберігають у витяжній шафі.

Розчин етилового спирту з масовою часткою 70 %

До колби місткістю 250 мл додають 70 мл етилового спирту з масовою часткою 96 % і 26 мл бідистильованої води, перемішують.

Розчин ТЕ (трис-EDTA)

До мірної колби місткістю 200 мл додають 0,4 мл розчину Трилону Б, 1 мл розчину трису, рН 7,5, доводять бідистильованою водою до мітки.

Розчин TNE (трис-NaCl-EDTA) для вимірювання концентрації ДНК на флуориметрі

У мірну колбу місткістю 100 мл додають 1 мл розчину трису, рН 7,5, 2 мл розчину натрію хлориду, 200 мкл розчину Трилону Б і доводять до мітки бідистильованою водою. Готовий розчин зберігають за температури від 18 °С до 25 °С не більше 6 місяців.

Розчин 10 × ТБЕ (трис-борат-EDTA)

Наважки трису масою 108 г та кислоти борної масою 55 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють у 800 мл бідистильованої води. Розчин збовтують на електромагнітній мішалці

до повного розчинення трису та борної кислоти, після чого додають 40 мл розчину Трилону Б та доводять бідистильованою водою до мітки 1000 мл.

Розчин 1 × ТБЕ (трис-борат-EDTA)

До мірної колби місткістю 1000 мл додають 100 мл розчину 10 × ТБЕ та доводять бідистильованою водою до мітки 1000 мл, ретельно перемішують.

Розчин поліакриламід з масовою часткою 30 %

Наважки акриламід масою 29 г та бісакриламід масою 1 г засипають до мірної колби місткістю 100 мл, додають 80 мл бідистильованої води і розчиняють, збовтуючи на електромагнітній мішалці до повного розчинення препарату за температури не більше 60 °С. Після розчинення доводять бідистильованою водою до мітки.

Розчин персульфату амонію (ПСА) з масовою часткою 10 %

Наважку ПСА масою 1 г засипають до мірної колби місткістю 10 мл і доводять бідистильованою водою до мітки, ретельно перемішують.

Поліакриламідний гель (ПААГ) з масовою часткою 10 %

Для приготування одного гелю розмірами 160 x 180 x 1 мм змішують 8 мл розчину поліакриламід з масовою часткою 30 %, 2,4 мл розчину 10 × ТБЕ, 13,6 мл бідистильованої води, 0,012 мл N,N,N',N'-Тетраметилетилендіаміну (ТЕМЕД), 0,01 мл розчину 10 % ПСА.

Розчин бромфенолового синього

Наважку бромфенолового синього масою 250 мг засипають до мірної колби місткістю 10 мл, додають мірним циліндром 8 мл бідистильованої води і розчиняють. Після цього доводять до мітки бідистильованою водою.

Розчин ксиленціанолу

Наважку ксиленціанолу масою 250 мг засипають до мірної колби місткістю 10 мл, додають мірним циліндром 8 мл бідистильованої води і розчиняють. Після цього доводять до мітки бідистильованою водою.

Розчин для нанесення

У колбу місткістю 10 мл автоматичним дозатором вносять 1 мл розчину бромфенолового синього, 1 мл розчину ксиленціанолу, 3 мл гліцерину, 5 мл бідистильованої води. Розчин ретельно перемішують.

Розчин етилового спирту з масовою часткою 10 %

До скляної колби місткістю 1000 мл заливають 100 мл етилового спирту з масовою часткою 96 % і додають 860 мл бідистильованої води.

Розчин кислоти азотної з масовою часткою 1 %

Кислоту азотну концентровану об'ємом 14 мл заливають до мірної колби місткістю 1000 мл із заздалегідь внесеними 800 мл бідистильованої води і доводять до мітки 1000 мл бідистильованою водою, ретельно перемішують.

Розчин срібла азотнокислого з молярною концентрацією 0,012 моль/л

Наважку срібла азотнокислого масою 1940 мг засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і додають 800 мл бідистильованої води. Розчин збовтують на електромагнітній мішалці до повного розчинення препарату. Доводять до мітки бідистильованою водою, ретельно перемішують.

Розчин натрію вуглекислого (безводного) з молярною концентрацією 0,28 моль/л

Наважку натрію вуглекислого (безводного) масою 30 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і додають 800 мл бідистильованої води. Розчин збовтують на електромагнітній мішалці до повного розчинення препарату. Доводять бідистильованою водою до мітки, ретельно перемішують.

Відновлювальний розчин

До колби місткістю 500 мл заливають 200 мл розчину натрію вуглекислого і вносять автоматичним дозатором 0,1 мл формаліну. Розчин ретельно перемішують.

Розчин кислоти оцтової з масовою часткою 10 %

Кислоту оцтову об'ємом 100 мл заливають до мірної колби місткістю 1000 мл із заздалегідь внесеними 800 мл бідистильованої води і доводять до мітки бідистильованою водою, ретельно перемішують.

Розчин Bind-Silane для фіксації поліакриламідного гелю на склі

До поліпропіленової мікропробірки об'ємом 1,5 мл заливають 1 мл етилового спирту, 250 мл оцтової кислоти з масовою часткою 10 %, 3 мкл Bind-Silane і ретельно перемішують. ³

3. ЕТАПИ ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯ

3.1. ВІДБІР ПРОБ

Відбирають середні (репрезентативні) проби, їх пакують, оформляють на зберігання згідно з ДСТУ 4138 [13]. Насіння, що відправляють на аналіз, обов'язково має бути здоровим, без теплового uszkodження під час сушіння, не заражене шкідниками, із запахом та кольором здорового зерна і супроводжуватися актом належної форми.

Кількість насінин, яку відбирають з середньої проби, що надійшла в лабораторію для ДНК-профілювання, має складати 100 штук, які досліджують як індивідуальні проби.

3.2. ВИДІЛЕННЯ ДНК

У методичних рекомендаціях описана методика виділення рослинної ДНК з застосуванням розчинів, наведених у розділі 2.

Для роботи з ДНК використовують тільки одноразові стерильні пластикові матеріали з спеціальним маркуванням «DNase-free». Усі маніпуляції, пов'язані із підготовкою проб, виконують з застосуванням дозаторів змінного об'єму та одноразових поліпропіленових пробірок і наконечників. Рекомендується працювати в одноразових рукавичках.

3.2.1. Підготовка до виділення ДНК

Виділити ДНК можливо з різних тканин рослини (насіння, коріння, листя тощо). Рекомендованим матеріалом є проростки. Для пророщування насіння беруть стерильні чашки Петрі з фільтрувальним папером, який звожують водою. Насінини пінцетом розкладають на відстані 1–2 см одна від одної, залежно від їхніх розмірів. Пророщують протягом 3–5 діб за кімнатної температури у темряві. Кількість насінин залежить від подальшого аналізу.

У випадку виділення ДНК безпосередньо з насінин або зернівок пророщування не потрібне.

3.2.2. Процедура виділення та очищення ДНК [14]

Мікропробірки місткістю 1,5 мл у кількості 100 шт. нумерують водостійким маркером та розміщують у штативі.

Сегменти проростків відсікають закриванням кришок мікропробірок.

Рослинний матеріал гомогенізують у мікропробірках скляною паличкою до повної мацерації тканин у 0,5 мл розчину ЦТАБ (лізуючому).

Мікропробірки інкубують протягом 1 год за 60 °С на водяній бані або в термостаті.

До мікропробірок додають рівний об'єм суміші хлороформ-ізоміловий спирт, ретельно перемішують на вортексі протягом 1 хв до утворення білої емульсії.

Центрифугують 10 хв у мікроцентрифузі за 13000 об./хв для розподілу фаз.

Відбирають верхній шар і переносять його у нову мікропробірку, промарковану відповідним номером.

Додають рівний об'єм ізопропилового спирту, обережно перемішують і залишають на 20 хв за кімнатної температури.

Центрифугують протягом 5–10 хв за 13000 об./хв. Рідину зливають.

Осад промивають 1,0 мл розчину етилового спирту з об'ємною часткою 70 %.

Центрифугують протягом 1 хв у мікроцентрифузі за 13000 об./хв, спирт зливають.

Мікропробірки з осадом залишають відкритими за кімнатної температури на 15 хв. Осад розчиняють у 0,3 мл розчину TE.

3.3. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДНК

Концентрацію виділеної ДНК рекомендується визначати на флуорометрі «TKO100 Dedicated mini Fluorometer» (Hofer Scientific Instruments, США) у TNE-буфері в присутності флуоресцентного барвника Hoechst 33258.

До чистої кювети вносять 2 мл TNE-буфера, додають 2 мкл барвника Hoechst 33258, перемішують, кювету вміщують у прилад, встановлюють на шкалі показник «0».

До кювети додають 2 мкл розчину ДНК стандарту з концентрацією 100 нг/мкл, кювету вміщують у прилад, встановлюють на шкалі показник 100 нг/мкл.

Вміст кювети видаляють, кювету промивають.

До чистої кювети вносять 2 мл ТНЕ-буфера, додають 2 мкл барвника Hoechst 33258, перемішують, кювету вміщують у прилад та перевіряють його, показник має визначитися «0».

До кювети вносять 2 мкл розчину ДНК зразка, перемішують, кювету вміщують у прилад, на шкалі його має з'явитись показник, що відповідає концентрації ДНК у зразка (нг/мкл).

Концентрацію ДНК зразка фіксують у робочому журналі.

3.4. ЗБЕРІГАННЯ ПРОБ

Розчин ДНК зберігають у холодильнику за 4 °С протягом дослідження.

3.5. ВИМОГИ ЩОДО БЕЗПЕКИ

При роботі з речовинами алергенної (ЦТАБ) та нейротоксичної (акриламід) дії необхідно суворо дотримуватись правил техніки безпеки, використовуючи засоби захисту обличчя, рук, очей. Зважувати сухі речовини тільки у витяжній шафі.

4. ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯ

4.1. ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснюють у стерильних мікропробірках (0,2 мл, 0,5 мл, 1,5 мл) або планшетах (у залежності від типу термоциклера).

Формують ПЛР-суміш для необхідної кількості зразків з урахуванням контрольної проби у відповідності з таблицею 1. Компоненти ПЛР-суміші додають строго у послідовності за таблицею 1. Процес виконується в одноразових гумових рукавичках у боксі.

Таблиця 1

Приготування ПЛР-суміші

Компонент	Кінцева концентрація
Бідистильована вода	—
10-кратний буфер для <i>Taq</i> -полімерази	1-кратний
Суміш дНТФ	0,2 мМ
Прямий праймер	0,25 мкМ
Зворотний праймер	0,25 мкМ
ДНК-полімераза <i>Taq</i>	0,5 одиниці активності

ПЛР-суміш перемішують на змішувачі вортекс та центрифугують за 1500 об./хв 10 сек для видалення повітряних бульбашок. Утворення піни або бульбашок під час перемішування не допускається.

До кожної пробірки вносять аліквоту отриманої ПЛР-суміші об'ємом 17 мкл. Додають 3 мкл розчину ДНК (20–100 нг), що виділена згідно з розділом 3.2. До пробірки контрольної проби замість розчину ДНК додають 3 мкл бідистильованої води. За необхідності (в залежності від типу термоциклера) поверх реакційного розчину нашаровують 25 мкл мінеральної олії. Центрифугують за 1500 об./хв 10 сек.

Підготовлені проби переносять у штатив термоциклера. Температурний режим ампліфікації такий: початкова денатурація — 3 хв за 94 °С, далі 1 хв за 94 °С; відпал праймерів — 1 хв за 52–60 °С (залежно від послідовності праймерів); елонгація — 2 хв за 72 °С, фінальна елонгація — 10 хв. Кількість циклів — 35.

4.2. ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводять в камерах для вертикального електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі, приготовленому згідно з розділом 2. Гель заливають у форми, як описано в інструкції користувача обладнання. Камеру для електрофорезу заповнюють 1 x ТБЕ розчином, приготовленим згідно з розділом 2.

До лунки планшети для нанесення ДНК вносять по 3 мкл розчину для нанесення, приготовленого згідно з розділом 2. З кожної пробірки з-під шару олії автоматичним дозатором відбирають по 10 мкл суміші і переносять у лунки планшети для нанесення ДНК з розчином для нанесення. Змінюють наконечник для кожної проби. До трьох лунок планшети з розчином для нанесення вносять по 5 мкл розчину маркера молекулярної маси ДНК. Перемішують ПЛР-суміш з розчином для нанесення шляхом піпетування (поява піни або бульбашок під час перемішування не допускається) та вносять до лунок гелевої пластини. До трьох лунок гелевої пластини (у дві крайні та одну всередині) вносять розчин маркера молекулярної маси ДНК. Електрофорез проводять за умови стабільної напруги 5–10 В/см протягом 1,5–2,5 год залежно від розмірів фрагментів ампліфікації. Припиняють електрофорез згідно з довжиною пробігу ксиленціанолу, який входить до складу розчину для нанесення. Приблизний розмір ампліфікованих фрагментів ДНК, разом з якими рухається ксиленціанол у 10 % ПААГ, складає 80 п. н.

4.3. ВІЗУАЛІЗАЦІЯ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ

Для візуалізації продуктів ампліфікації використовують розчини, приготовлені згідно з розділом 2.

Гелеву пластину промивають дистильованою водою та кладуть на 10 хв у розчин етилового спирту. Переносять гелеву пластину на 6 хв у розчин азотної кислоти, після чого її промивають деіонізованою водою 5 хв. Переносять гелеву пластину у розчин срібла азотнокислого та витримують протягом 20 хв у темряві, після чого промивають гелеву пластину двічі дистильованою водою та переносять в охолоджений до 4 °С відновлюючий розчин до появи забарвлення фрагментів

ампліфікації та фрагментів маркера молекулярної маси. Після появи чітких смуг (фрагментів ампліфікації та маркера молекулярної маси) гелеву пластину промивають кілька разів дистильованою водою, після чого кладуть на 5 хв у розчин оцтової кислоти і потім ретельно промивають 2 хв у дистильованій воді.

Забарвлену гелеву пластину розміщують між двома листами прозорої поліетиленової плівки та використовують для відеодокументування результатів дослідження. Після відеодокументування забарвлену гелеву пластину зберігають у холодильнику за 4 °С протягом терміну дослідження.

4.4. ДОКУМЕНТУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Після електрофорезу на доріжках гелю мають бути чітко помітні одна (гомозиготний генотип) або дві (гетерозиготний генотип) смуги однакової інтенсивності, які відповідають алелям досліджуваного МС-локусу. Відеозображення електрофореграм отримують за системою відеодокументування з програмним забезпеченням згідно з інструкцією користувача обладнання. Визначають розміри фрагментів ампліфікації у парах нуклеотидів (п. н.) на підставі порівняння їх із розмірами фрагментів маркера молекулярної маси за пакетами комп'ютерних програм, наприклад GelAnalyzer2010.

4.5. ФРАГМЕНТ-АНАЛІЗ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АВТОМАТИЧНОЇ СИСТЕМИ ДЕТЕКЦІЇ

В умовах масового ДНК-профілювання зразків доцільно використовувати автоматизовані системи детекції з програмним забезпеченням для обробки даних, до яких відносять ДНК-аналізатори.

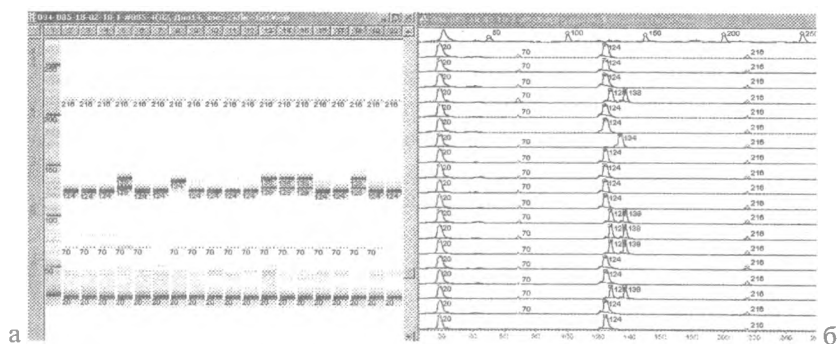
Залучення таких систем дає можливість виконання фрагмент-аналізу, зокрема МС-локусів за скороченого терміну, спрощує документування результатів і обрахунки у порівнянні зі звичайним електрофорезом у ПААГ.

Фрагмент-аналіз МС-локусів може бути здійснений в автоматизованій системі ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech, Швеція), до якої входить електрофорезна камера з гелевою касетою і термопластою, УФ-бокс для формування гелів, комп'ютер зі спеціальним про-

грамним забезпеченням, набори реактивів для приготування гелів. Детекція сигналу в електрофорезній камері заснована на збудженій лазером флуоресценції фрагментів ДНК, мічених флуорофором — ціаніном (Cy5').

Основні вимоги до проведення аналізу: наявність мічених ціаніном (Cy5') продуктів ампліфікованої ДНК та внутрішніх і зовнішніх стандартів — фрагментів ДНК певного відомого розміру, також мічених флуоресценцією міткою Cy5', згідно з якими система визначатиме розміри алелів у зразках, що аналізуються. Зовнішній стандарт або маркер молекулярної маси — набір з 3–10 мічених фрагментів ДНК певного відомого розміру, «алельні сходи». В якості внутрішнього стандарту добирають три (мінімум два) фрагменти різного розміру, які охоплюють зону розподілу досліджуваних фрагментів. Результати аналізу можна одержати у вигляді звичайної електрофореграми з набором ДНК-профілів або як денсітограму з позначенням зон детекції сигналів (рис. 1).

Конструкція і програмне забезпечення системи дає можливість у реальному часі спостерігати за процесом електрофорезу, детектувати і визначити розмір мічених ПЛР-фрагментів, обробляти та аналізувати результати.



4.5.1. Процедура підготовки і хід аналізу

Для підготовки касети до заливки гелю обробляють скло і термоплату розчином Bind-Silane. Для цього кілька крапель наносять на верхню частину скла (не більше 5 см від краю) на бік без емблеми ALFexpress II (для термоплати — 2–3 см від краю), відполіровують насухо паперовим рушником. Зону з Bind-Silane обережно обробляють дистильованою водою, відполіровують насухо, обробляють етанолом і знову відполіровують. Знизу вгору обробляють етанолом всю пластину і відполіровують насухо. Встановлюють два скляних спейсери у призначені для них заглиблення з лівого та правого країв термоплати і прикріплюють їх до кремнієво-гумового сальника, злегка натиснувши. Опускають скло на термоплату так, щоб його оброблена розчином Bind-Silane поверхня знаходилась всередині. Встановлюють два затискачі гелю вздовж лівого та два — вздовж правого боків касети на кілька сантиметрів вище «точки входу» лазерного променя до касети. Встановлюють гребінку у верхню частину касети, зрушують її на себе до тих пір, доки вона просовується. Встановлюють зібрану касету в УФ-бокс для формування гелів (ReproSet™).

Для приготування гелю змішують вміст маленького пластикового балона (ReproGel™ High Resolution Solution B) з великим (ReproGel™ High Resolution Solution A), виключаючи утворення бульбашок у розчині. Нагвинтивши кришку з соплом на великий балон, обрізають наконечник сопла. Гель заливають з нижнього краю касети, рухаючи балон назад-вперед уздовж відкритої щілини між скляними пластинами. Розчин розподіляють повільно і рівномірно, дотримуючись постійного тиску на балон протягом процедури. Ослаблення тиску призведе до утворення бульбашок у гелі. Завдяки капілярному ефекту розчин буде затягуватись у простір між термоплатою і склом і повільно заповнювати його. Залишають заповнену касету протягом 1 хв, доки не припиниться розповсюдження фронту гелю. Видаляють будь-які бульбашки, що утворилися в гелі, уловлювачем (0,2 мм пластиковий засіб у вигляді смужки з прорізаним жолобком) або постукуванням по склу. Експонують гель у УФ-боксі ReproSet™ протягом 10–12 хв для полімеризації. Готовий гель використовують безпосередньо після полімеризації, зберігаючи не більше 1 год при кімнатній температурі. Приготований розчин для заливки гелю у подальшому використовують за необхідності, зберігаючи у темряві. Далі запускають прилад і модулі програмного обладнання ALFwin, переносять касету з гелем до приладу, попередньо

налагоджують лазер і створюють файл робочого журналу згідно з інструкцією виробника. Рекомендовані умови проведення електрофорезу для гелів, полімеризація яких йде з використанням ультрафіолетового випромінювання, наведені у технічному керівництві, а також у [15].

4.5.2. Приготування зразків для нанесення

Зразки для нанесення (продукти ампліфікації ДНК, що одержані шляхом ПЛР з міченими флуоресцентним барвником ціаніном Су5' праймерами, зовнішні стандарти) у кількості 1–2 мкл змішують з буфером для нанесення, що містить денатуруючий агент і барвник типу ксиленціанолу у рівному співвідношенні. До кожного зразка додають три (мінімум два) внутрішні стандарти окремо або їх суміш. Зразки ретельно перемішують мікродозатором.

У кожному експерименті мають бути зовнішні стандарти. Необхідно приготувати і нанести їх мінімум у дві кінцеві доріжки гелю. Як зовнішні стандарти використовують фірмовий набір постачальника обладнання 50–500 з кроком 50 п. н. або фрагменти ДНК, які обрані за внутрішні стандарти, у кількості не менше трьох на одну доріжку гелю.

Приготовлені зразки денатурують 2–3 хв на водяній бані за температури 95 °С, ретельно охолоджують на льоду або кладуть до морозильної камери на 2–5 хв.

Якщо досягнута робоча температура за замовчуванням, про що сигналізуватиме рівне горіння жовтої індикаторної лампи температури, обережно витягують гребінку з гелю, піднімаючи її строго вгору, уникаючи нахилу в будь-якому напрямі. Ретельно промивають лунки буфером, що міститься у буферному резервуарі, за допомогою шприца 50 мл з наконечником, щоб видалити рештки гелю. Наконечник зі сплющеним кінцем Eppendorf Gelloder встановлюють на мікродозатор (0–20 мкл) і наносять зразки у доріжки гелю 1–40. Промивають наконечник у нижньому буферному резервуарі перед нанесенням кожного наступного зразка.

4.5.3. Електрофорез у системі ALFexpress II

Вміщують електроди в буферні резервуари: чорний для верхнього резервуара, червоний — для нижнього. Приєднують електроди до роз'ємів на приладі. Заново налаштовують лазер, закривають кришку приладу,

натискають кнопку «Start» у програмі контролю ALFWin Control на панелі інструментів. Далі відображається діалогове вікно Start Run. Перевіряють індикаторні лампи температури і лазера на приладі (мають постійно горіти). На екрані ALFWin Control перевіряють значення коефіцієнта пропускання лазера (Transmittance) і температури у вікні Manual. Значення Transmittance для лазера має перевищувати 70 %.

Далі дотримуються вимог програми: зберегти або задати ім'я файлу, обравши необхідні кнопки у діалоговому вікні, яке відкриється на екрані монітора. Якщо всі дії виконані правильно, на екрані монітора з'явиться повідомлення про старт. Індикаторна лампа приладу підтвердить, що процес електрофорезу почався. Якщо є хоча б якісь недоліки, система припинить стартувати і проінформує про це відповідним повідомленням на екрані монітора. Після усунення причин треба знову повторити всю вищеописану у даному пункті процедуру. За процесом розподілення фрагментів можна спостерігати безпосередньо у реальному часі у відповідному вікні програми ALFWin Control.

Середній термін проведення електрофорезу складає від 1–1,5 до 2–2,5 год в залежності від розміру фрагментів (2,5 год відповідає пробігу фрагментів розміром приблизно 500 п. н.)

По закінченню необхідного терміну натискають End у програмі контролю ALFWin Control і припиняють електрофорез. Файл результатів автоматично створюється в кінці електрофорезу і може бути відкритий в програмі ALFWin Fragment Analyser. Програма формує відповідний файл для обліку Fragment Analyser files [* .flx] і файл [* .fbk], в якому зберігаються умови проведення електрофорезу.

Контролювати хід даного процесу можна шляхом створення спеціального файлу *pre-run* з результатом розподілу на момент його перегляду в меню, що розташоване на панелі інструментів і з'являється у процесі роботи системи. Запускають програмне обладнання ALFWin Fragment Analyser 1.00 і аналізують результати експерименту згідно з інструкцією [15].

Після закінчення електрофорезу відкривають кришку приладу, роз'єднують і видаляють електроди з буферних резервуарів, від'єднують конектори термостатичного циркулятора від касети, видаляють касету з приладу, виливають буфер з верхнього і нижнього резервуарів, видаляють затискачі гелю і обережно розбирають касету. Видаляють спейсери, вставивши тонку пластмасову смужку під один кінець спейсера і поступово переміщують вниз по всій довжині або легко зігнувши його. Не застосовують леза або інші гострі предмети. Очищують частини ка-

сети гелю, використовуючи амортизуючу прокладку в раковині, теплу воду (приблизно 30 °С), м'яку нейлонову щітку і нефлуоресціюючий детергент, такий, наприклад, як 5 % (v/v) Decon 90 (Decon Laboratories Limited, Велика Британія, поверхнево-активний миючий і дезінфікуючий засіб, не містить фосфатів, хлору та лугів).

4.5.4. Візуалізація й обробка даних

Візуалізують результати і обробляють дані за комп'ютерним програмним забезпеченням, таким як ALFWin Fragment Analyser. Багато команд меню в модулі ALFWin Fragment Analyser можуть бути активовані застосуванням комп'ютерної миші для натискування кнопок на панелі інструментів або комбінуванням клавіш клавіатури. Доступність цих командних опцій залежить від активного поля або вікна. Опис функції активованої кнопки панелі інструментів відображається на екрані монітора.

Для візуалізації розмірів (у п. н.) у файлі аналізу [* .flx] активують відповідне вікно і обирають необхідні опції меню. По виконанню послідовних необхідних дій у меню біля кожного поміченого сайта з'являться числові значення, які відповідають розмірам детектованих фрагментів у п. н. Якщо для аналізу в меню обрано округлення значень до 1 або 2 знаків після коми (1 decimal, 2 decimals), числові значення розміру визначених фрагментів будуть дробові, наприклад, 278,5 (278,56). Для одержання цілих числових значень розміру фрагментів обирають Integer (ціле значення) або Even (ціле усереднене).

За результатами електрофорезу програма формує таблицю, яку можна переглянути у відповідному вікні.

Зберегти оброблений файл результатів можна, обравши загальновідому команду збереження: Save (зберігається назва файла, місце знаходження).

4.5.5. Рекомендації щодо безпеки роботи

Усі етапи роботи виконують у гумових рукавичках. При роботі з речовинами алергійної та нейротоксичної дії (акриламід, Bind-Silane та інші) строго обов'язково застосовують засоби захисту рук, обличчя, очей, дотримуються правил техніки безпеки.

Якщо є будь-які сліди гелю на захисному покритті УФ-боксу для формування гелів, видаляють їх водою і детергентом.

5. НАПРЯМИ АНАЛІЗУ ЗА ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯМ

5.1. ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ЗРАЗКІВ НА ПРИКЛАДІ СОРТІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ

Мета — диференціювати, тобто розрізнити сорти або лінії пшениці м'якої озимої за ДНК-профілюванням.

Суть аналізу полягає в ампліфікації ДНК п'яти індивідуальних насінин або рослин, тобто генотипів, з кожного сорту пшениці м'якої озимої, що тестується, шляхом ПЛР з праймерами до МС-локусів (додаток) і порівнянні визначених алелів, що відображені на електрофоретичних спектрах ампліфікації ДНК.

Для диференціації сортів пшениці пропонується вісім МС-маркерів (додаток), що узгоджується з рекомендацією UPOV щодо використання восьми МС-локусів з цією ж метою. За проведеними нами попередніми дослідженнями [16–20] зазначений набір МС-маркерів диференціював (відрізняв один від одного) навіть близько-споріднені сорти пшениці м'якої озимої. Запропоновані МС-маркери є апробованими та застосовуються в багатьох лабораторіях світу вже понад 10 років [21–31].

Виявлення одного і того ж алеля за певним МС-локусом при аналізі п'яти індивідуальних насінин (генотипів) сорту слід інтерпретувати як свідчення гомогенності сорту. Як показали результати моделювання щодо визначення гомогенності або гетерогенності сорту [32] мінімально необхідно вибіркою, за якою вірогідність хибного визначення гетерогенного сорту гомогенним не перевищувала б 5 %, становить п'ять рослин. Якщо хоча б один з досліджених п'яти генотипів має алель, відмінний від визначених для інших чотирьох рослин з вибірки сорту, сорт має бути визначено як гетерогенний.

Слід зазначити, що іноді сорти, які створені в одному селекційно-му центрі або у групі селекційних установ певної зони вирощування, важко розрізнити за фенотипом через те, що різноманіття цих сортів звужене. Такі сорти з більшою вірогідністю споріднені генетично, близькі за генами, які контролюють адаптивність рослин, та можуть бути подібними і за морфологічними ознаками. У такому випадку рекомендуємо проводити ДНК-профілювання.

Диференціація сортів пшениці за ДНК-профілюванням і МС-маркерами здійснюється:

- якщо виникає питання, чи належить насіння одному і тому ж сорту, чи різним сортам;
- якщо необхідно диференціювати сорти, які за морфологічними ознаками важко розрізнити;
- якщо насіння подібних за морфологічними ознаками сортів (або сорти) неможливо диференціювати за допомогою електрофорезу запасних білків зерна.

Даний підхід пропонуємо застосовувати при державному сортови-пробуванні.

5.1.1. Схема диференціації

1. З п'яти індивідуальних паростків кожного сорту виділяють ДНК (розділ 3). Визначається концентрація виділеної ДНК кожного зразка препарату за допомогою флуорометричного вимірювання, як описано в розділі 3.3. Для проведення ПЛР з праймерами до МС-локусів використовують 20–100 нг ДНК (як описано в розділі 4.1). Продукти ампліфікації аналізують за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (за розділом 4.2).

2. Отриманий електрофоретичний профіль фрагментів ампліфікації ДНК документують, як описано в розділі 4.4. Спектри ампліфікації сортів порівнюють один з одним. Складають матрицю алелів. У матриці відмічають наявність алеля з певною молекулярною масою як С, відсутність алеля — А. Сформовану матрицю алелів записують у file.txt за комп'ютерною програмою «Блокнот».

3. Якщо сорти мають різні алелі за електрофоретичними спектрами продуктів ампліфікації одного і більше МС-локусів, можна констатувати, що вони є різними сортами.

4. Сорти, спектри продуктів ампліфікації яких збігаються за всіма МС-локусами, визначають як ідентичні.

5. Якщо потрібно диференціювати групу сортів і графічно підтвердити відмінність аналізованих сортів, будують дендрограму за програмою MEGA 6, яка є в мережі Internet у вільному доступі. Для цього матрицю щодо алелів кожного генотипу сорту узагальнюють у сумарну. Таку інформацію по кожному сорту використовують для визначення генетичних дистанцій між тестованими сортами (функція програми MEGA 6 «Compute Pairwise Distances»). Наступним

кроком застосовують метод UPGMA або NJ-tree для побудови дендрограми, яка графічно відображає диференціацію сортів за ДНК-профілюванням. Наприклад, на рисунку 2 наведено дендрограму сортів пшениці, створених в СГІ – НЦНС, та сорту Безоста 1, який інтенсивно залучається в селекційний процес вітчизняними науковцями-селекціонерами.

5.2. ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ЧИСТОТИ

Мета — визначити генетичну чистоту насіння сорту, лінії, гібрида ячменю, пшениці, кукурудзи, соняшнику.

Суть аналізу щодо визначення генетичної чистоти за ДНК-профілюванням полягає у ампліфікації ДНК кожної зі 100 індивідуальних насінин сорту, лінії, гібрида, що тестується, шляхом ПЛР з праймерами до МС-локусів і порівнянні електрофоретичних спектрів ампліфікації ДНК індивідуальних насінин у межах кожного МС-локусу, що аналізується. Ідентичність ДНК-спектрів індивідуальних насінин у межах кожного з проаналізованих МС-локусів свідчить про генетичну чистоту. Для визначення генетичної чистоти сорту, лінії, гібрида необхідний ПЛР-аналіз за трьома МС-локусами, для яких за попередніми дослідженнями [15; 32–35] визначені максимальні значення індексу поліморфності (polymorphism index content, PIC).

У партії насіння, що аналізується, електрофоретичні спектри ампліфікованої ДНК індивідуальних насінин у межах МС-локусу мають співпадати між собою, тобто мати однакові алелі. У партії насіння, що аналізується, може зустрічатися певна кількість насінин, які не відповідають такій вимозі. Наявність хоча б одного такого результату свідчить про те, що насіння аналізованої партії не є генетично чистим.

ПЛР проводять згідно з розділом 4.1, застосовуючи праймери згідно з додатком. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі, візуалізація і документування продуктів ампліфікації — згідно з розділами 4.2–4.4.

Результати аналізу електрофореграм фіксують у лабораторному журналі.

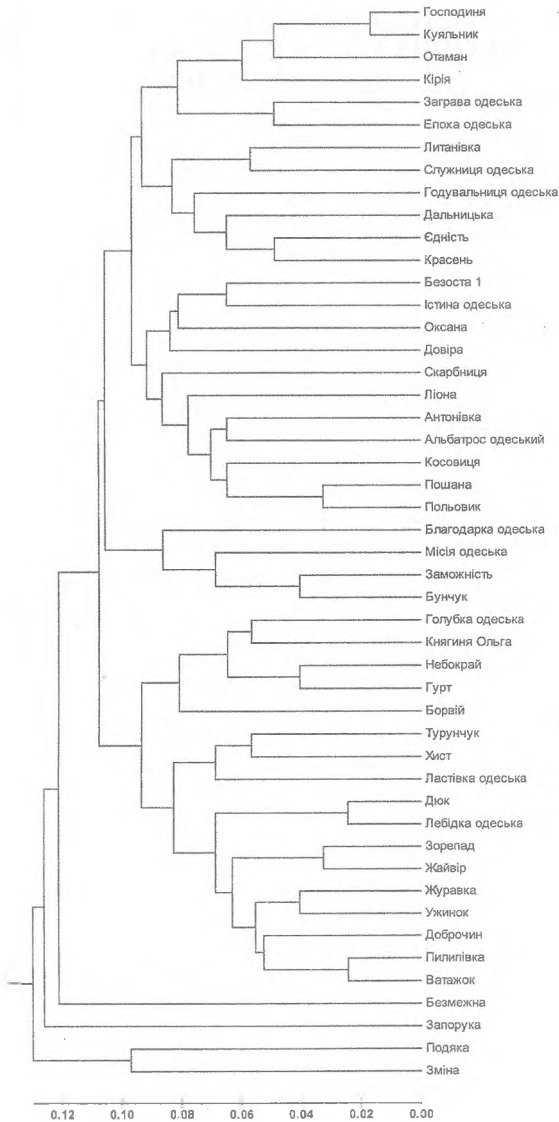


Рис. 2. Дендрограма сортів пшениці м'якої озимої побудована за генетичними дистанціями, розрахованими за алгоритмом UPGMA за даними аналізу 8 MS-локусів

5.3. ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ГІБРИДНОСТІ НАСІННЯ ПРОСТИХ ГІБРИДІВ ПЕРШОГО ПОКОЛІННЯ КУКУРУДЗИ ТА СОНЯШНИКУ

Мета — визначити рівень гібридності насіння простого гібрида першого покоління кукурудзи чи соняшнику.

Високий рівень гібридності насіння першого покоління соняшнику і кукурудзи забезпечує прояв ефекту гетерозису та значну врожайність гібридів. Тому необхідні надійні методи контролю рівня гібридності.

Основними способами оцінки цього показника є ґрунтовий контроль, що потребує чималих посівних площ і часу та значною мірою є суб'єктивним аналізом; а також спосіб встановлення гібридності за електрофорезом запасних білків (геліантину у соняшнику, зеїну у кукурудзи), суть якого така: з окремих насінин виділяють запасні білки, електрофорезом у поліакриламідних гелях аналізують білкові спектри на електрофореграмах та визначають рівень гібридності відсотком насінин, у спектрах яких поєднуються компоненти спектрів материнської та батьківської ліній. До недоліків останнього способу треба віднести низький рівень поліморфізму запасних білків, що не дозволяє частину ліній відрізнити одну від іншої.

Дана технологія визначення рівня гібридності насіння соняшнику і кукурудзи першого покоління базується на ДНК-профілюванні ліній та гібридів за МС-локусами геному. Аналіз поліморфізму МС-локусів геному дозволяє отримувати стабільні кодомінантні маркери. Успадкування алелів певного локусу здійснюється за законами Менделя, тобто за кожним локусом гібрид першого покоління отримує один алель від материнської лінії, другий — від батьківської. Отже, електрофоретичні спектри рослин першого покоління мають бути ідентичними та поєднувати алелі вихідних форм.

Гібридність партій насіння визначається шляхом порівняльного аналізу спектрів ампліфікації МС-локусів геному, а також відсотка типових для певного гібрида рослин. Дана технологія забезпечує високу точність та об'єктивність оцінки, скорочує термін її виконання, дає можливість визначити гібридність навіть тоді, коли батьківські форми є генетично близькоспорідненими.

Суть аналізу — виявити кількість (у відсотках) окремих насінин простого гібрида першого покоління кукурудзи чи соняшнику з од-

наковим алейним складом за всіма дослідженими МС-локусами. Для визначення рівня гібридності необхідно провести ПЛР-аналіз за трьома МС-локусами, за якими виявлено поліморфізм між батьківськими лініями. Насінини простого гібрида першого покоління повинні мати однакові алелі в межах кожного локусу. У партії насіння простого гібрида першого покоління можуть виявитися окремі насінини, що не відповідають означеній вимозі, такі насінини є негібридними.

5.3.1. Порядок визначення

ПЛР проводять згідно з розділом 4.1, використовуючи праймери згідно з додатком. Електрофоретично розділяють продукти ампліфікації в поліакриламідному гелі, візуалізують і документують продукти ампліфікації згідно з розділами 4.2–4.4.

Досліджують батьківські лінії за МС-локусами, для чого використовують праймери з додатку. За трьома МС-локусами, за якими визначено поліморфізм між батьківськими лініями, досліджують 100 насінин простого гібрида першого покоління.

Рівень гібридності у % визначають за формулою (1):

$$P_{\Gamma} = \frac{K - НГ}{K} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

де P_{Γ} — рівень гібридності, %; K — загальна кількість досліджених проб, тобто 100; $НГ$ — кількість негібридних проб; 100 — коефіцієнт перерахунку на %.

5.3.2. Реєстрація та оформлення результатів

Визначені розміри алелів за кожним дослідженим локусом для кожної проби реєструють у лабораторному журналі.

5.3.3. Контролювання результатів

Під час електрофоретичного розподілу продуктів ПЛР у поліакриламідних гелях для продуктів кожної ПЛР відводять окрему доріжку в гелевій пластині.

Відтворюваність результатів оцінюють для кожної окремої проби за всіма протестованими локусами шляхом порівняння розмірів

алелів, отриманих у двох повтореннях. У разі неспівпадіння розмірів алелів повторюють випробування, починаючи з розділу 3.1.

При появі трьох і більше смуг однакової інтенсивності повторюють випробування, починаючи з розділу 4.1.

Кожна постановка ПЛР супроводжується контрольною пробою, в ПЛР-суміш якої замість розчину ДНК додають бідистильовану воду. Після електрофорезу на доріжці, що відповідає контрольній пробі, не має бути жодних смуг. З появою смуг у контрольній пробі випробування повторюють, починаючи з розділу 4.2.

5.4. РЕЄСТРАЦІЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗРАЗКІВ НА ПРИКЛАДІ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ

Мета — зафіксувати генотип зразка у вигляді генотипової формули та / або виявити ідентичність, тобто тотожність тестованого зразка з іншим відомим (референтним) об'єктом за сукупністю певних ознак (набору алелів МС-локусів).

Суть аналізу. Реєстрація лінії або гібрида кукурудзи включає ДНК-профілювання за 20 МС-локусами та запис у вигляді генотипової формули, в якій відображено аельний склад досліджених локусів. Ідентифікація зразка кукурудзи включає ДНК-профілювання за 20 МС-локусами та порівняння отриманого набору алелів з такими референтних зразків. Проведення молекулярної ідентифікації потребує наявності референтних зразків, ліній, гібридів або їхніх генотипових формул.

МС-локуси для ДНК-профілювання обирають за такими критеріями: розташування на різних хромосомах (по два — на кожній хромосомі), індекс поліморфності — не менше 0,5. Інформація про МС-локуси та послідовності праймерів, що їх фланкують, є загальнодоступною — у відкритому доступі в електронній базі даних MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org>). У додатку наведено приклад тест-панелі 20 МС-локусів.

5.4.1. Опрацювання результатів

Реєстрація у вигляді генотипової формули

Отримані розміри фрагментів ампліфікації МС-локусу (умовно алелів) у парах нуклеотидів (п. н.) записують у вигляді формули. Ге-

нотипова формула містить перелік кодів досліджених локусів як літер англійського алфавіту (або як назв локусів) та інформацію щодо розмірів фрагментів ампліфікації в парах нуклеотидів (п. н.) даного локусу як нижній індекс. У випадку гомозиготного стану локусу вказують тільки один алей.

Приклад оформлення генотипової формули гібрида N.

За результатами ДНК-профілювання MS-локусів виявлені такі фрагменти ампліфікації:

- за локусом phi011 (код локусу — A) — 213 п. н.;
- за локусом phi064 (код локусу — B) — 73 п. н., 113 п. н.;
- за локусом phi083 (код локусу — C) — 121 п. н.;
- за локусом phi127 (код локусу — D) — 128 п. н.;
- за локусом phi053 (код локусу — E) — 168 п. н., 210 п. н.;
- за локусом phi073 (код локусу — F) — 178 п. н.;
- за локусом phi093 (код локусу — G) — 282 п. н.;
- за локусом phi079 (код локусу — H) — 177 п. н., 200 п. н.;
- за локусом phi024 (код локусу — I) — 156 п. н.;
- за локусом phi128 (код локусу — J) — 99 п. н., 113 п. н.;
- за локусом phi070 (код локусу — K) — 78 п. н.;
- за локусом phi078 (код локусу — L) — 122 п. н., 126 п. н.;
- за локусом phi034 (код локусу — M) — 146 п. н.;
- за локусом phi116 (код локусу — N) — 152 п. н., 172 п. н.;
- за локусом phi115 (код локусу — O) — 93 п. н.;
- за локусом phi015 (код локусу — P) — 102 п. н.;
- за локусом phi027 (код локусу — Q) — 142 п. н., 157 п. н.;
- за локусом phi065 (код локусу — R) — 129 п. н.;
- за локусом phi062 (код локусу — S) — 149 п. н., 176 п. н.;
- за локусом phi084 (код локусу — T) — 150 п. н.

Генотипова формула гібрида N така:

$A_{213} B_{73,113} C_{121} D_{128} E_{168,210} F_{178} G_{282} H_{177,200} I_{156} J_{99,113} K_{78} L_{122,126} M_{146} N_{152,172} O_{93}$
 $P_{102} Q_{142,157} R_{129} S_{149,176} T_{150}$

Якщо використовувати назви локусів, генотипова формула гібрида N така:

$phi011_{213} phi064_{73,113} phi083_{121} phi127_{128} phi053_{168,210} phi073_{178} phi093_{282}$
 $phi079_{177,200} phi024_{156} phi128_{99,113} phi070_{78} phi078_{122,126} phi034_{146} phi116_{152,172}$
 $phi115_{93} phi015_{102} phi027_{142,157} phi065_{129} phi062_{149,176} phi084_{150}$

Перевірка ідентичності

Результати ДНК-профілювання тестованого зразка у вигляді набору алелів досліджених локусів порівнюють з таким референтного зразка. Розбіжності між алельними спектрами вже одного локусу дозволяють зробити висновок про неідентичність порівнюваних об'єктів. Збіг алельних спектрів тестованого та референтного зразків за 20 локусами свідчить про ідентичність об'єктів.

1. Жмурко О. В. Актуальні питання адаптації українського законодавства у сфері захисту прав на сорти рослин до законодавства Європейського Союзу / О. В. Жмурко, Є. В. Тисячний, Н. Б. Якубенко // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. — К.: Алефа, 2005. — № 2. — С. 147–155.
2. Закон України від 2 серпня 2006 р. № 60-V «Про приєднання України до Міжнародної конвенції з охорони нових сортів рослин» // Охорона прав на сорти рослин: Офіц. бюл. — К.: Алефа, 2006. — Вип. 3, ч. 1. — С. 62.
3. Сиволап Ю. М. ДНК-технології в реєстрації й охороні прав на сорти / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. — 2005. — № 1. — С. 66–74.
4. Лещук Н. В. Державна реєстрація сортів овочевих культур — основа формування національних сортових ресурсів / Н. В. Лещук, М. М. Зрібняк // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин: Наук.-практ. журн. — 2005. — № 2. — С. 86–96.
5. Морфологічні ознаки сільськогосподарських культур для визначення відмітності, однорідності та стабільності сортів рослин // Охорона прав на сорти рослин: Офіц. бюл. — К.: Алефа, 2006. — Вип. 1, ч. 3. — 280 с.
6. Загальне введення до експертизи на вирізняльність, однорідність і стабільність та розробки гармонізованих описів нових сортів рослин // Міжнародний союз з охорони прав нових сортів рослин. — 2002. — 20 с.
7. UPOV. Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS). UPOV/INF/18/1. — 2011. — 26 p.
8. Jones H. Variety protection and plant breeders' rights in the 'DNA Era' / H. Jones, C. Norris, J. Cockram [et al.] // Diagnostics in Plant Breeding. — 2013. — Vol. 15, N 3. — P. 369–402.
9. UPOV. Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction («BMT guidelines»). UPOV/INF/17/1. — 2010. — 13 p.
10. Методические материалы Госкомиссии по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур при министерстве сельского хозяйства СССР. — Москва, 1984. — 68 с.

11. TG/3/11 Corr. Corrigendum to guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. — UPOV, 1996. — 30 p.
12. Рибалка О. І. Генетична гетерогенність сортів пшениці одеської селекції за аельним складом GLI/GLU-локусів / О. І. Рибалка, М. В. Червоніс, М. А. Литвиненко // Вісник аграрної науки. — 2008. — № 2. — С. 54–59.
13. ДСТУ 4138–2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. — Київ: Держстандарт України, 2003. — 173 с.
14. Rogers S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // Plant Mol. Biol. — 1985. — Vol. 5. — P. 69–76.
15. Бальвінська М. С. Використання фрагмент-аналізу для ДНК-типуювання сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.): Методичні рекомендації / М. С. Бальвінська, І. Л. Холявіцька, Ю. М. Сиволап. — 2010. — 18 с.
16. Kolesnyk O. O. The courses of nurseries control and variety investigation systems founded on molecular markers / O. O. Kolesnyk, S. V. Chebotar, Yu. M. Sivolap [et al.] // Зб. наук. праць СГІ — НЦНС. — 2013. — Вип. 22 (62). — С. 89–99.
17. Колесник О. О. Диференційна здатність методів ідентифікації сортів пшениці за допомогою мікросателітного аналізу та комп'ютерного визначення морфометричних параметрів зерна / О. О. Колесник, С. В. Чеботар, О. М. Хохлов, Ю. М. Сиволап // Вісник ОНУ імені І. І. Мечникова. Сер.: Біологія. — Одеса, 2009. — Т. 14, вип. 8. — С. 27–42.
18. Колесник О. О. Диференціація сучасних сортів озимої м'якої пшениці Півдня України за аельним складом мікросателітних локусів / О. О. Колесник, С. В. Чеботар, О. М. Хохлов, Ю. М. Сиволап // Зб. наук. праць СГІ — НЦНС. — 2012. — Вип. 19 (59). — С. 47–59.
19. Колесник О. О. Порівняння методів опису та ідентифікації сортів пшениці / О. О. Колесник, С. В. Чеботар, О. М. Хохлов [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць. — Київ: Логос, 2012. — Т. 2. — С. 104–112.
20. Колесник О. О. Співставлення методів диференціації та ідентифікації сортів пшениці м'якої озимої за низкою агрономічних ознак й морфометричними параметрами зерна та за аельним складом мікросателітних локусів / О. О. Колесник, С. В. Чеботар, О. М. Хохлов, В. І. Файт // Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Сер.: Біологія. — 2015. — Вип. 1 (34). — С. 46–54.

21. Röder M. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat / M. S. Röder, J. Plashke, S. U. König [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* — 1995. — Vol. 246. — P. 327–333.
22. Röder M. S. Construction and analysis of a microsatellite-based database for European wheat cultivars / M. S. Röder, K. Wendehake, V. Korzun [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — Vol. 106, N 1. — P. 67–73.
23. Somers D. J. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / D. J. Somers, P. Isaac, K. Edwards // *Theor. Appl. Genet.* — 2004. — Vol. 109, № 6. — P. 1105–1114.
24. Khlestkina E. K. Genetic diversity in cultivated plants — loss or stability / E. K. Khlestkina, X. Q. Huang, F. J.-B. Quenum [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2004. — Vol. 108, № 8. — P. 1466–1472.
25. Varshney R. K. Genic Microsatellite markers in plants: features and application / R. K. Varshney, A. Graner, M. E. Sorrells // *Trends in Biotechnology.* — 2005. — Vol. 23, N 1. — P. 48–55.
26. Landjeva S. Evaluation of genetic diversity among Bulgarian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties during the period 1925–2003 using microsatellites / S. Landjeva, V. Korzun, G. Ganeva // *Genet. Resour. Crop. Evol.* — 2006. — Vol. 53, № 8. — P. 1605–1614.
27. Balfourier F. A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate / F. Balfourier, V. Roussel, P. Strelchenko [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2007. — Vol. 114, № 7. — P. 1265–1275.
28. Hayden M. J. Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat / M. J. Hayden, T. M. Nguyen, A. Waterman // *Mol. Breed.* — 2008. — Vol. 21, № 3. — P. 271–281.
29. Landjeva S. Genetic diversity of old bread wheat germplasm from the Black Sea region evaluated by microsatellites and agronomic traits / S. Landjeva, G. Ganeva, V. Korzun [et al.] // *Gen. Res. Crop Evol.* — 2014. — doi:10.1017/S1479262114000781.
30. Zanke C. Genetic architecture of main effect QTL for heading date in European winter wheat. C. Zanke, J. Ling, J. Plieske [et al.] // *Frontiers in Plant Science | Plant Genetics and Genomics.* — 2014. — Vol. 5, A. 217. — doi: 10.3389/fpls.2014.00217
31. Wang L. Assessment of wheat variety distinctness using SSR markers / L. Wang, J. Qiu, L. Chang [et al.] // *J. Integrative Agriculture.* — 2015. — Vol. 14, N 10. — P. 1923–1935.
32. Колесник О. О. Молекулярно-генетичний поліморфізм сортів пшениці м'якої озимої та асоціації алелів мікросателітних локу-

- сів і господарсько цінних ознак: дис. ... канд. біол. наук: за спец. 03.00.22 — молекулярна генетика / О. О. Колесник. — Київ, 2015. — 248 с.
33. Balvinska M. S. Microsatellite markers for identification and registration of barley varieties in Ukraine / M. S. Balvinska, Yu. M. Sivolap // Applied Sciences and technologies in the United States and Europe: common challenges and scientific findings. — 23.12.2013. — P. 1–2.
34. Солоденко А. Є. Мікросателітні маркери в дослідженні генетичного різноманіття ліній та гібридів соняшнику / А. Є. Солоденко // Вісник ОНУ імені І. І. Мечникова. Сер.: Біологія. — 2011. — Т. 16, вип. 6. — С. 42–48.
35. Кожухова Н. Е. Молекулярні маркери в дослідженні геному кукурудзи (*Zea mays* L.) / Н. Е. Кожухова: автореф. дис. ... д. б. н. — Одеса: Інтерпринт, 2008. — 39 с.

Панель мікросателітних маркерів для ДНК-профілювання зразків

Мікросателітний локус (код)	Хромосомна локалізація	Нуклеотидна послідовність (5'–3') праймерів		Т відпалу, °С	Діапазон розмірів алелів (п. н.)	Кількість алелів на локус	PIC
		прямого	зворотного				
Пшениця							
<i>Xtaggap</i> (V)	1B	gcagacctgtgcattggtc	gatctggccsacaagcgc gatatagtggcagcaggatagc	60	207–265	6	0,53
<i>Xgwm095</i> (B)	2A	gatcaaacacacaccctcc	aatgcaagtgaiaaacccg	60	110–130	6	0,65
<i>Xgwm155</i> (C)	3A	caatcatftccccctccc	aatcatggaaatccatagcc	60	129–152	10	0,84
<i>Xgwm186</i> (E)	5A	gcagagcctggttcaaaaag	cgcccttagcgagagctatg	60	102–142	9	0,67
<i>Xgwm408</i> (T)	5B	tcgatttattgggccaactg	gtataattcgttcacagcacgc	55	148–192	6	0,51
<i>Xgwm325</i> (P)	6D	tttctctgtcgttctctccc	ttttacgcgtcaacgacg	55	115–150	10	0,83
<i>Xgwm577</i> (U)	7B	atggcataattgggaaattg	tgtttcaagcccaacttctatt	55	137–175	5	0,65
<i>Xbarc126</i> (Q)	7D	ccattgaaaccggattgagtcg	cgttccatccgaaatcagcac	52	138–166	10	0,73
Ячмінь							
EBmac501 (A)	1H	agggacaiaaatggctag	Cy5'-acttaagtgccatgcaag*	55	124–164	11	0,63
Bmac93 (D)	2H	gggagctctgagcctactg	Cy5'-cgtttgggacgtatcaat	55	150–162	7	0,76
Bmag225 (F)	3H	cgagtagtccccatgtgac	Cy5'-aacacacciaaiaatattacat	55	136–166	12	0,88
EBmac701 (G)	4H	tggcactaaagcaaaagac	Cy5'-atgatgagaactcttcaccc	55	132–148	9	0,79
Bmac96 (I)	5H	tcacgatgaggtatgatcaaa	Cy5'-gctatggcgtactatgtatggt	55	154–186	12	0,89
Ebmac602 (K)	6H	tgcaactgtgctattaaggg	Cy5'-accgaaactaaatgaactact	55	138–172	7	0,70
Bmag120 (N)	7H	gtcacatagacagttgtcttcc	Cy5'-atttcatcccaaggagac	55	226–264	10	0,80

Мікросателітний локус (код)	Хромосома локалізація	Нуклеотидна послідовність (5'–3') праймерів		Т відпалу, °С	Діапазон розмірів алелів (п. н.)	Кількість алелів на локус	PIC
		прямого	зворотного				
Кукурудза							
phi011 (A)	1	tggtgctcggtcaccatacc	gsacasacasaggacgacagt	55	213–228	4	0,65
phi064 (B)	1	ccgaattgaaatagctgcgagaacct	acaatgaacgggtgtatcaacacgc	55	73–113	7	0,83
phi083 (C)	2	caaacatcagccagagacaaggac	attcatcgacgcgtcacagtctact	55	121–137	4	0,75
phi127 (D)	2	atatgcattgctggaactggaagga	aattcaaacacgcctcccagagtgt	55	96–128	4	0,76
phi053 (E)	3	aaccacaactactccggcag	ctgcctctcagattcagagattgac	55	168–210	5	0,65
phi073 (F)	3	gtgcgagagccttgacca	aagggttagggcgaggaa	55	178–214	5	0,71
phi093 (G)	4	agtgcgtcagcttcatgcctacaag	aggccatgcatgcttgcacaatggataca	55	282–298	4	0,69
phi079 (H)	4	tggtgctcgttccaaatctacga	gcagtggtggttccaacagacaa	55	177–200	4	0,78
phi024 (I)	5	actgttccaccaaaccaagccgaga	agtagggttgggatctcctcc	55	156–162	3	0,61
phi128 (J)	5	ttgctcggatgaagaaaatagctttcc	atcttgcaactagactgaggcaacca	55	99–113	3	0,60
phi070 (K)	6	gctgagcgtcagttcatccag	ccatggcagggtctctcaag	55	78–88	4	0,68
phi078 (L)	6	cagcaccagactacatgacgtgtaa	gggcccgcgagtgatgtgagt	55	122–126	4	0,63

phi034 (M)	7	tagcgacaggatggcctctct	ggggagcagccttctgtct	55	122–146	4	0,78
phi116 (N)	7	tcctgccgggactcctg	gcatacggccatggatggga	55	152–172	4	0,68
phi115 (O)	8	gctcgtgttccgctgaa	accatcacctgaatccatcaca	55	93–109	3	0,61
phi015 (P)	8	gcaactgacctacccttccga	acgtgcatcattaccgggaag	55	82–102	4	0,84
phi027 (Q)	9	cacagcacgttgcggatttctct	gcgtacgtacacgaagacac	55	142–157	3	0,61
phi065 (R)	9	agggacaatactggagacacag	cgatctgcacaagtgagtagtc	55	129–156	4	0,63
phi062 (S)	10	ccaaccgctaggctacttcaa	atgccatgcgttcgctctgtatc	55	149–176	5	0,63
phi084 (T)	10	agaaggaatccgatccccaagc	caccctacttgaggaaaacc	55	150–162	3	0,52
Соняшник							
Ha 1608 (H)	нв**	gatcttagtccgccac	gatggcatttggctagac	60	188–190	2	0,50
ORS 4 (F)	нв	acaagtgcgctggtgagc	acatgaaacacgagctaaacc	60	157–172	3	0,51
ORS 78 (A)	нв	gttcgtcagtagatgtctgc	ttccctctggaaagtgtca	60	165–178	5	0,68
ORS 815 (D)	нв	gaaagcagcaatggttcataa	accaagtgcaaacctaga	60	183–192	5	0,65
ORS 509 (B)	нв	ttccctctggaaagtgtca	ttccctctggaaagtgtca	60	187–195	4	0,63
ORS 1024 (O)	нв	gggaagtggcctgtctatgat	aacacaccgaaatcacctatgaa	60	238–244	5	0,68
ORS 1036 (I)	нв	cccttctacttctattttctatca	ctaagaggggtcggatgatitc	60	242–252	2	0,44

Примітки: * – нуклеотидна послідовність з флуоресцентною міткою Су5', ** – не визначено.

Науково-виробниче видання

**ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ, ІДЕНТИФІКАЦІЯ,
ВИЗНАЧЕННЯ ТИПОВОСТІ ТА ГІБРИДНОСТІ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР
ЗА ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯМ**

Методичні рекомендації

Автори:

**БАЛЬВІНСЬКА Марина Сергіївна,
ВОЛКОВА Наталія Едуардівна,
КОЛЕСНИК Ольга Олександрівка,
СОЛОДЕНКО Анжела Євгенівна,
ЧЕБОТАР Сабіна Віталіївна**

Завідувачка редакції *Т. М. Забанова*
Редактори: *В. Я. Крижанівський, М. Г. Музикант*

Підписано до друку 18.12.2015. Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 2,33.
Тираж 100 прим. Зам. № 147.

Друкарня видавництва «Астропринт»
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21
Тел.: (0482) 37-07-95, 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855

www.astroprint.odessa.ua

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