

## Молекулярно-генетичні дослідження біоенергетичних культур (*Miscanthus*, *Salix*).

На сьогоднішній день традиційні енергоресурси є дорогими та лімітованими, при цьому їх використання спричиняє негативний вплив на навколишнє середовище та викликає залежність від постачальників енергоресурсів. Вказані причини спонукають до пошуку нових альтернативних джерел відновлювальної енергії.

Використання біоенергетичних культур в сільському господарстві України дозволить значно зменшити залежність нашої держави від природних джерел енергії (нафти та газу), які імпортуються з інших країн. Надзвичайно бурхливий розвиток біоенергетики у світі спонукав до широкого використання нових культур, які раніше не були об'єктом уваги сільгоспвиробників. Це призвело до створення популяцій біоенергетичних культур, походження яких часто не встановлено, а подекуди, взагалі не досліджувалось. Наприклад, одна з найбільш перспективних біоенергетичних культур міскантус характеризується широким рівнем різноманіття за морфологією та плоідністю. Пояснити таку різноманітність, на даний час не можливо, оскільки джерела походження представників різних видів, а іноді і в межах одного виду, не встановлено.

Разом з тим, з погляду селекції найбільш важливими вважають три види:

- *M.sacchariflorus* – міскантус цукроквітковий. Це вид зі стеблами заввишки 2,5 – 3,0 м з довгими ризомами, який швидко колонізує ґрунтовий простір, утворюючи суцільні плантації. У більшості випадків це тетраплоїди з кількістю хромосом 76.
- *M.sinensis* – міскантус китайський. Висота стебел 2-3,5 м. Має ризоми довжиною 5 – 10 см, повільно колонізує ґрунт, утворюючи купини зі значною кількістю пагонів. Кількість хромосом варіює від 35 до 57. Популяції анізоплоїдні. Частіше зустрічаються диплоїдні рослини з кількістю хромосом 37.

- *M.giganteus* – міскантус гігантський або гігантеус. Рослини цього виду дуже високі – до 5м. Відрізняються високою продуктивністю, зимостійкістю, посухостійкістю. Це природний триплоїдний гібрид між міскантусом китайським та цукроквітковим із кількістю хромосом 57. Розмножується лише вегетативно.

Найбільш цінним за показниками продуктивності представником роду *Miscanthus*, на сьогоднішній день є вид *Miscanthus giganteus*, що за генетичною природою є триплоїдом, і який, поки що не піддається відтворенню традиційними методами селекції. Іншим представником даного роду є *Miscanthus sinensis*, або міскантус китайський, який в іноземній літературі ще називають *elephant grass*, за здатність рослин досягати висоти до 3 метрів. В результаті інтенсивного використання даного виду міскантусу отримано величезну кількість популяцій даної форми. При цьому не встановлено генетичні джерела їх походження, локальність їх використання та особливості їх модифікаційних варіацій.

Вирощування культури міскантусу спрямовано на отримання продуктивної біомаси, природного полімеру целюлози. Для підвищення результативності селекційної роботи для видів даного роду ефективним є встановлення базових даних про рівні видового поліморфізму, що дозволяє спрогнозувати можливість покращення даної культури. Тому проведення досліджень в даному напрямку є актуальними і корисними для селекційної практики.

Оскільки, рослини роду *Miscanthus* характеризується підвищеною урожайністю сухої біомаси, посухостійкістю, зимостійкістю та наявністю у своєму складі природних біополімерів, сучасна селекція спрямована на отримання сортів з високими базовими показниками продуктивності. За даними *IENICA-CROPS DATABASE*, продуктивність *Miscanthus giganteus* на сьогоднішній день складає 11,7-25,3 т/га сухої біомаси в рік, а результати визначення хімічного складу підтверджують вміст целюлози в межах 44%, лігніну 17% та геміцелюлози 24%.

Енергетична верба (*Salix*) є найбільш розповсюдженою енергетичною культурою в світі. Це пов'язано з тим, що генотип верби один з найбагатших після рису і це дає можливість створювати нові сорти та гібриди для різноцільового використання.

В останні роки на території України енергетична верба набуває широкого використання як біоенергетична культура і є об'єктом створення багаторічних насаджень. Для направленої селекційної роботи з даною культурою існує необхідність оцінювання рівня поліморфізму для паспортизації перспективних видів і генотипів, їх філогенетичної оцінки та з метою майбутнього селекційного покращення даної культури.

Метою даного проекту є дослідження рівнів молекулярно-генетичного поліморфізму та встановлення філогенетичних зв'язків у представників різних популяцій та груп рослин біоенергетичних культур родів *Miscanthus* та *Salix*, які входять до колекції ІБКіЦБ НААН України. Реалізація даного проекту дасть змогу розробити нові методологічні підходи для оцінювання рівнів молекулярно-генетичного поліморфізму у популяціях рослинного матеріалу нових біоенергетичних культур.

Для виконання поставленої мети передбачено пошук молекулярних маркерів для диференціації різних видів рослин роду *Miscanthus* та *Salix* за використання RAPD-PCR методик.

Відбір вихідного матеріалу базується на потребах селекційної практики, що спрямована на максимальну реалізацію потенціалу генетичного різноманіття досліджуваних видів. Сучасна селекція біоенергетичних культур спрямована на підвищення вмісту целюлази, сухої речовини, підвищення продуктивності біомаси. Застосування новітніх методів аналізу селекційного матеріалу дозволить значно скоротити затрати, та оптимізувати селекційний процес.

За поточними даними хромосомний набір рослин роду *Miscanthus* варіює від диплоїдів (38 хромосом) до гексаплоїдів (114 хромосом), в той час як рослини роду *Salix* мають диплоїдний набір хромосом  $2n = 38$ .

Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму рослин родів *Miscanthus* та *Salix* з метою оцінки їх генетичного різноманіття створено модельну популяцію. Відбір зразків проводився на основі колекції біоенергетичних культур ІБКіЦБ.

Таблиця 1.1

**Колекція форм міскантусу, отриманих з різних джерел  
вирощування**

№ зразку	Видова назва	Назва сорту/гібриду	Від кого отримано рослинний матеріал
1	Міскантус гігантський ( <i>Miscanthus giganteus</i> )	Зінченко В.О.	Квак В.М. (ІБКіЦБ НААН) (Зінченко В.О. – ЖНАУ)
2	Міскантус олигостахіус ( <i>Miscanthus oligostachyus</i> )	регенерант <i>in vitro</i> №1	Гонтаренко С.М. (ІБКіЦБ НААН)
3	Міскантус гігантський ( <i>Miscanthus giganteus</i> )	різновид Австрійський	Квак В.М. (ІБКіЦБ НААН)
4	Міскантус гігантський ( <i>Miscanthus giganteus</i> )	різновид Польський	Квак В.М. (ІБКіЦБ НААН)
5	Міскантус цукроквітковий ( <i>Miscanthus sacchariflorus</i> )	сорт Снігова Королева	Гонтаренко С.М. (ІБКіЦБ НААН)
6	Міскантус гігантський ( <i>Miscanthus giganteus</i> )	регенерант <i>in vitro</i> №1	Бех Н. С. (ІБКіЦБ НААН)
7	Міскантус гігантський ( <i>Miscanthus giganteus</i> )	регенерант <i>in vitro</i> №2	Бех Н. С. (ІБКіЦБ НААН)
8	Міскантус китайський ( <i>Miscanthus sinensis</i> )	регенерант <i>in vitro</i>	Бех Н. С. (ІБКіЦБ НААН)
10	Міскантус китайський сріблястий ( <i>Miscanthus sinensis var. Silverspine</i> )	№13-1	Бех Н. С. (ІБКіЦБ НААН)
11	Міскантус китайський сріблястий ( <i>Miscanthus sinensis var. Silverspine</i> )	№13-2	Бех Н. С. (ІБКіЦБ НААН)
V3	Міскантус гігантський ( <i>Miscanthus giganteus</i> )	Зінченко В.О. третє вегетативне покоління	Квак В.М. (ІБКіЦБ НААН) (Зінченко В.О. – ЖНАУ)

Таблиця 1.2

**Колекція форм верби енергетичної, відібраної для проведення  
молекулярно-генетичного аналізу**

№ зразку	Видова назва	Інші характеристики
1	Верба прутувидна	жіноча та чоловіча

	<i>S. viminalis L.</i>	форми
2	Верба тритичинкова, класична <i>S. triandra L.</i>	жіноча форма
3	Верба матсуда (звивиста) <i>S. matsudana Vill.</i>	стать не встановлена
4	Верба попеляста <i>S. cinerea L.</i>	стать не встановлена
5	Верба біла <i>S. alba L.</i>	стать не встановлена
6	Верба біла, різновид з жовтою корою <i>S. alba L.</i>	стать не встановлена
7	Клон верби шведський <i>S. viminalis L.</i>	стать не встановлена

У роботі використано лабораторні методи: виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції (RAPD - PCR аналіз), електрофоретичний розподіл одержаних ПЛР-продуктів в агарозному гелі.

При роботі з *Miscanthus giganteus* краще використовувати рослинний матеріал отриманий з культури *in vitro* або відібрати ризоми, які готуються для проростання. При залучені останніх отримаємо більш чистий матеріал виділених нуклеїнових кислот без зайвих домішок(пігментів). Рослинам *in vitro* властиві тонкі стінки клітин, тому в них більш ефективним є руйнування клітинних стінок.

### **Хід роботи**

1. Рослинний матеріал завчасно заморозити рідким азотом або ліофілізувати, подрібнити його в мікроцентрифужній пробірці об'ємом 1,5 мл з 0,6 мл лізуючого розчину. При роботі з ризомами зняти верхні покривні оболонки, перетерти бруньки, перенести отримане до мікроцентрифужної пробірки та додати 0,6 мл лізуючого розчину.
2. Інкубувати у термостаті циркуляторному протягом 40 хвилин при 60°C.

3. Додати рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1) та добре перемішати на вортексі протягом 2 хвилин до утворення білої емульсії.
4. Центрифугувати 4 хвилини у мікроцентрифузі при 11000 g.
5. Відібрати верхню водяну фазу і перенести у чисту мікроцентрифужну пробірку.
6. Повторити очистку сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), як описано в пунктах 3, 4, 5.
7. Додати ізопропиловий спирт у співвідношенні 1:0,6 (водяна фаза:ізопропиловий спирт), обережно перемішати і залишити на 12 годин в холодильнику при температурі +4°C
8. Центрифугувати протягом 20 хвилин при 9000 g.
9. Злити рідину, а осад промити. Для цього додати 50-100 мкл 70 %-96% етилового спирту, центрифугувати протягом двох хвилин в мікроцентрифузі при 11000 g та злити спирт.
10. Висушити осад при кімнатній температурі.
11. Розчинити ДНК у 50 – 100 мкл розчину TE і додати РНКазу А (кінцева концентрація 1 мкг/мл).

### **3.3 Виділення ДНК з *Salix*.**

Для виділення ДНК з *Salix* відбирають неkwіткові бруньки. Якщо процедуру виділення необхідно провести не в вегетаційний період тоді відбирають потрібні гілки та розташовують їх у воді, бажано в темному місці, для прокинення «сплячих» бруньок, з яких в подальшому виділяють ДНК.

### ***Хід роботи***

1. В мікроцентрифужну пробірку відбирають 1-2 бруньки. Рослинний матеріал необхідно завчасно заморозити рідким азотом або

- ліофілізувати. Подрібнити його в пробірці об'ємом 1,5 мл з 0,6 мл лізуючого розчину до утворення однорідної суміші.
2. Інкубувати у термостаті циркуляторному протягом 15 хвилин при 65°C.
  3. Після інкубації охолоджуємо при кімнатній температурі протягом 10 хвилин.
  4. Додати рівний об'єм хлороформу та добре перемішати на вортексі протягом 2 хвилин до утворення білої емульсії.
  5. Центрифугувати 10 хвилини у мікроцентрифузі при 11000 g.
  6. Відібрати верхню водяну фазу і перенести у чисту мікроцентрифужну пробірку додати 0,5 об'єму хлороформу.
  7. Центрифугувати 5 хвилини у мікроцентрифузі при 11000 g.
  8. Відібрати верхню водяну фазу і перенести у чисту мікроцентрифужну пробірку додати подвійний об'єм 96% етанолу.
  9. Обережно перемішати, висаджати протягом години при температурі +17-+20°C
  10. Центрифугувати протягом 20 хвилин при 9000 g.
  11. Злити рідину. Осад двічі промити. 50 мкл 96% етилового спирту, центрифугувати протягом двох хвилин в мікроцентрифузі при 11000 g та злити спирт.
  12. Висушити осад при кімнатній температурі.
  13. Розчинити ДНК у 50 – 100 мкл розчину TE і додати РНКазу А (кінцева концентрація 1 мкг/мл).

#### **4. Вимірювання концентрації ДНК**

Визначити концентрацію виділеної ДНК можна в агарозному гелі (за відсутності РНК), для цього:

1. Готують 0,8 % агарозний гель у 1<sup>X</sup> TBE.
2. Після охолодження до 60 °С, додають розчин бромистого етидію до кінцевої концентрації 1 мкг/мл. ***Увага! Бромистий етидій є мутагеном. Суворо дотримуватись техніки безпеки!***
3. Гель заливають в електрофорезну підложку для гелю і встановлюють гребінку.
4. Після полімеризації гелю виймають гребінку і переносять його в електрофорезний блок.
5. Відбирають по 5 мкл стандартних розчинів та зразків виділеної ДНК, додають по 5 мкл 6<sup>x</sup> буферу для нанесення (див. п. 4.3.2) та перемішують (під час перемішування не допускається поява піни або бульбашок).
6. Отриману суміш, автоматичним піпет-дозатором, вносять в лунки гелю.
7. Проводять електрофорез протягом 30 хв при невисокій напрузі 80 - 100 В.
8. Фотографують гель в УФ-променях. Концентрація зразків визначається відповідно до стандартної ДНК.



## **5. Застосування ПЛР-аналізу для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму біоенергетичних культур.**

### **5.1 Принцип полімеразної ланцюгової реакції**

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) - універсальний носій спадкової інформації, що являє собою подвійну нитку, скручену в спіраль. Кожна нитка складається з послідовно з'єднаних нуклеотидів. Нитки ДНК протилежно направлені, тобто 5'-кінцю однієї нитки відповідає 3'-кінець іншої. Унікальною властивістю ДНК є її подвоєння. Цей процес дістав назву - реплікація. В живій клітині реплікація включає три основні стадії:

- 1) розкручування спіралі ДНК та розходження ниток (денатурація);
- 2) приєднання олігонуклеотидних затравок(відпал);
- 3) добудова ланцюгів дочірніх ниток.

В ПЛР ці ж процеси відбуваються в пробірці у циклічному режимі. Перехід від однієї стадії реакції до іншої досягається шляхом зміни температури інкубації суміші. При нагріванні компонентів реакції до 93 – 95 °С відбувається денатурація ДНК. Для переходу до наступного етапу, відпалу праймерів, реакційну суміш охолоджують до 50 – 65 °С. Після цього суміш нагрівають до 70 – 72 °С (оптимум роботи Taq-полімерази) для синтезу дочірніх ниток ДНК. Далі цикл повторюється знову, причому у якості матриці крім виділеної ДНК виступають і ланцюги синтезовані в попередньому циклі. У результаті таких циклів багатократно подвоюється або ампліфікується фрагмент ДНК між двома праймерами. Ці фрагменти називаються ампліконами, їх довжина, зазвичай, складає декілька сот нуклеотидів. Після електрофоретичного розділення продуктів ПЛР у гелі, амплікони мають вигляд дискретних смуг. Стандартна ПЛР включає 25-40 циклів, з кожним циклом кількість ампліконів збільшується по експоненті

(наближається до залежності  $2^n$ , де  $n$  – число циклів), таким чином синтезується аналітично доступна кількість ДНК.

## **5.2.Розчини для ПЛР**

- 1.  $10^X$ буфер для Taq-полімерази.** Буфер містить такі компоненти 100 мМ Тріс НСІ рН 9,0; 500 мМ КСІ; Triton X-100. Тріс НСІ для ПЛР-буфера беруть з рН 9,0 через те, що при підвищенні температури рН Тріс-буфера знижується (температурний коефіцієнт  $\sim -0,031^{\text{од. рН/}^\circ\text{C}}$ ) і при  $72^\circ\text{C}$  складає  $\sim 7,5$ . КСІ стимулює на 40-60 % активність Taq-полімерази. Triton X-100 перешкоджає адсорбції білка на поверхні пробірки.
- 2.  $\text{MgCl}_2$**  На молекулярному рівні  $\text{Mg}^{2+}$  утворює комплекси з dNTP's, саме ці комплекси є субстратом для Taq-полімерази. Діапазон робочих концентрацій: 0,5-5,0 мМ (10 мМ - інгібує полімеразу на 40-50%). Підвищення концентрації  $\text{Mg}^{2+}$  підвищує температуру плавлення ДНК, крім того впливає на специфічність і ефективність ПЛР (збільшується вихід, але суттєво зменшується специфічність). Таким чином, занадто низька концентрація  $\text{Mg}^{2+}$  - низький вихід, занадто висока - безліч смуг неспецифічної ампліфікації. Оптимум залежить від послідовностей матриці та праймерів, тому підбирається експериментально.
- 3. Taq-полімераза.** Термостабільна ДНК-полімераза виділена з термофільного мікроорганізму *Thermus aquaticus*. Точність Taq-полімерази залежить від концентрації  $\text{Mg}^{2+}$ , dNTP's та збалансованості dNTP' і рН, у середньому, частота помилок 1 заміна на 100-300 п.н.
- 4. Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів.** Комплекси dNTP's з іонами  $\text{Mg}^{2+}$  є субстратом для Taq-полімерази. Розчин дезоксинуклеотидтрифосфатів повинен мати нейтральний рН, оскільки dNTP's мають значну буферну ємність. Діапазон концентрації від 50 до 500 мкМ, причому чим нижча концентрація dNTPs, тим вища точність синтезу.

**5. Праймер.** Олігонуклеотидна затравка довжиною від 10 до 30 нуклеотидів, яка фланкує досліджувані послідовності ДНК. В залежності від типу ПЛР використовують один праймер або пару (прямий (F) та зворотній (R)). Діапазон концентрації від 0,1 до 1 мкМ

**6. Вода для ПЛР.** Для ПЛР використовують деіонізовану та перегнану через мембранний фільтр з порами 0,22 мкм воду.

Розчини (крім олігонуклеотидів ) входять до складу набору реагентів PCR Mix 2x(NEOGENE), який зручно використовувати для PCR ампліфікації в науково-дослідній лабораторії молекулярної біології і генетики, ДНК-діагностиці.

Склад набору PCR Mix 2x(NEOGENE):

1. 2x суміш для ПЛР – 2 пробірки з розчином блакитного кольору по 525мкл (зберігати при -20<sup>0</sup>С)

2. Пробірки поліпропіленові для ПЛР – 100 пробірок об'ємом 0,2 мкл

3. Вода деіонізована для ПЛР – 1 пробірка ,1,0 мл прозора кришка (зберігати при -20<sup>0</sup>С)

4. ПЛР масло – 1 пробірка об'ємом 2,0 мл, жовта кришка.

### **5.3 Проведення ПЛР**

Постановка ПЛР проводилась з використанням двох наборів реагентів PCRMix 2x(NEOGENE). До складу одного входить інгібована для «гарячого старту»Taq-полімераза, інший містить звичайну Taq-полімеразу.

Щоб запобігти забрудненню, приготування реакційної суміші проводять в одноразових гумових рукавичках в боксі для приготування реакційної суміші.

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл для проведення ISSR- або RAPD-аналізу містить такі компоненти: 10мкл2<sup>x</sup>суміші для ПЛР; 5 мкл праймеру; 20 нг досліджуваної ДНК. Також мають бути позитивний та негативний контролю.

Мікроцентрифужні пробірки об'ємом 0,2 мл, у яких буде проходити реакція, маркують. Відповідну кількість компонентів реакції вносять у промарковані мікроцентрифужні пробірки у регламентованій послідовності. Для запобігання контамінації рекомендовано використовувати спеціальні наконечники з анти-аерозольними фільтрами.

Реакційну суміш перемішують (при перемішуванні не допускається поява піни або бульбашок) та осаджують в центрифугі при 700 g 10 секунд.

Пробірки з сумішшю поміщають у програмований термостат «ТС 48» (CleaverScientificLtd, Великобританія).

Для активації полімерази «гарячого старту» потрібно обов'язково програмувати цикл попередньої денатурації на 95°C не менше 7 хвилин.

Реакцію ампліфікації проводили за таких температурних умов:

- для аналізу з використанням HotStartTaq-полімерази: 1 шаг - початкова денатурація - 10 хв. при 95°C; 2 шаг - 30 цикли – 1 хв. денатурація при 94°C, 40с. відпал при t55-68°C, елонгація 1 хв. при 72°C; 3 шаг - елонгація 5 хв. при 72°C.
- для аналізу з використанням Taq-полімерази: 1 шаг - початкова денатурація - 2хв. при 95°C; 2 шаг - 30 цикли – 1 хв. денатурація при 94°C, 40с. відпал при t 55-68°C, елонгація 1 хв. при 72°C; 3 шаг - елонгація 5 хв. при 72°C.

Щоб розрахувати оптимальну температуру відпалу праймеру необхідно врахувати його GC склад, що визначає оптимальну температуру плавлення.

По закінченню реакції продукти ампліфікації розділяють в агарозному гелі з допомогою електрофорезу.

## **6. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації.**

Принцип методу електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації полягає в тому що молекули ДНК в розчинах існують у формі іонів, які під

дією електричного поля рухаються до електроду, при цьому коротші молекули переміщуються швидше, ніж довші, що призводить до їх розділення. Отже, якщо зняти електричне поле до того, як всі іони досліджуваної суміші досягнуть електродів, то її компоненти розподіляться у відповідності з їх електрофоретичною рухливістю. На швидкість руху ДНК в гелі впливає концентрація гелю, напруга електричного поля, температура та склад електрофорезного буферу.

Більш зручніший метод розділення це горизонтальний гель-електрофорез, для якого використовують 1-4% агарозний гель. Вибір відсодовості гелю залежить від очікуваної молекулярної маси отриманих ампліконів.

## **6.1 Реактиви і розчини**

1. Агароза для електрофорезу II типу.
2. Борна кислота –  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $M_m = 61,83$ ).
3. Бромід етидію; етидій бромистий; EtBr; 2,7-діамін-10-етил-9-фенілфенантрідіум бромід; EtBr, -  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$  ( $M_m = 394,3$ ) розчин 10 мг/мл, для електрофорезу.
4. Бромфеноловий синій; 3', 3'', 5', 5''-тетрабромфенолсульфонафтален -  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{Br}_4\text{O}_5\text{SNa}$  ( $M_m = 692,0$ ).
5. Гліцерин; гліцерол; 1,2,3,-Пропантриол –  $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$  ( $M_m = 92,10$ ).
6. EDTA; етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль дигідрат;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; EDTA - ( $M_m = 372,24$ ).
7. Ксиленціанол -  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$ , ( $M_m = 538,6$ ).
8. Тріс (гідрооксиметил) метиламін; Тріс; TRIZMA; 2-аміно-2-гідрооксиметил-1,3-пропандіол -  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2 \text{OH})_3$  ( $M_m = 121,10$ ).

### ***10<sup>X</sup> TBE (буфер для електрофорезу)***

Для приготування 1 л розчину зважують 108 г Тріс та 55 г борної кислоти, наважки переносять в мірну колбу і додають 800 мл води. Після

розчинення додають 40 мл 0,5 М ЕДТА рН 8,0 та доводять дистильованою водою об'єм до 1 л. Зберігають у холодильнику при 4 °С до 6 місяців.

### ***1<sup>X</sup> ТВЕ (буфер для електрофорезу)***

Для приготування 1 л розчину в мірний циліндр наливають 100 мл 10<sup>X</sup> ТВЕ та доводять дистильованою водою об'єм до 1 л, ретельно перемішують і переносять в колбу для зберігання. Зберігають при кімнатній температурі не більше 1 місяця.

### ***Агарозний гель (с = 2 %)***

Для приготування 100 мл гелю зважують 2 г агарози, наважку переносять в колбу та доводять об'єм до 100 мл 1<sup>X</sup> ТВЕ. Колбу з сумішшю нагрівають в мікрохвильовій печі до повного розчинення агарози. Суміш охолоджують при кімнатній температурі до 60 °С. Автоматичним дозатором додають 10 мкл броміду етидію та ретельно перемішують. Отриману суміш заливають в кювету для заливки гелю та за допомогою гребінки формують лунки. Через 50 хвилин гребінку видаляють.

*Допускається зберігання гелю в 1<sup>X</sup> ТВЕ в холодильнику при температурі 4 °С не більше 7 діб.*

### ***6<sup>x</sup> буфер для нанесення (для електрофорезу в гелі)***

Для приготування 10 мл буферу в колбу автоматичним дозатором вносять: -1 мл 2,5 % розчину бромфенолового синього;

-1 мл 2,5 % розчину ксиленціанолу;

-3 мл гліцерину;

-5 мл дистильованої води.

Розчин ретельно перемішують. Зберігають у холодильнику при 4 °С не більше 6 місяців.

## **6.2 Хід роботи.**

Для проведення горизонтального електрофорезу пластину агарозного гелю, що являє собою застиглу після плавлення в

електрофорезному буфері агарозу з додаванням барвника ДНК – броміду етидію, поміщають в камеру приладу для горизонтального гель-електрофорезу заповнену 1<sup>x</sup> ТБЕ. З кожної мікроцентрифужної пробірки, автоматичним піпет-дозатором відбирають по 10 мкл суміші і переносять на планшет для нанесення ДНК, до кожного зразка додають 10 мкл 6<sup>x</sup> буферу для нанесення та перемішують (під час перемішування не допускається поява піни або бульбашок). Отриману суміш переносять у лунки гелю, також в окрему лунку гелю вносять маркер молекулярної маси.

Електрофорез проводять в умовах постійної напруги електричного поля 2,5 В/см протягом 2-3 годин. Після закінчення електрофорезу гель поміщають на транслюмінатор, який випромінює світло в ультрафіолетовому діапазоні (254 – 310 нм). Енергія ультрафіолету поглинається ДНК в області 260 нм, передається барвнику, що проявляється у флуоресценції в оранжево-червоній частині видимого спектру (590 нм). Результати візуалізації фіксують за допомогою відеосистеми та зберігають.

Продукти ампліфікації зберігають в морозильній камері при -20°C протягом року.

## ***7. Реєстрація електрофоретичного розподілу ампліконів та статистична обробка даних***

Для даних, отриманих за допомогою ПЛР-аналізу, робили наступні припущення:

- різні фрагменти ампліфікації є незалежними локусами;
- фрагменти ампліфікації однакової молекулярної маси, тестовані у різних зразків, визначаються як ідентичні.

ПЛР в якій використовують один праймер дає змогу аналізувати декілька локусів одночасно (рис. 1).

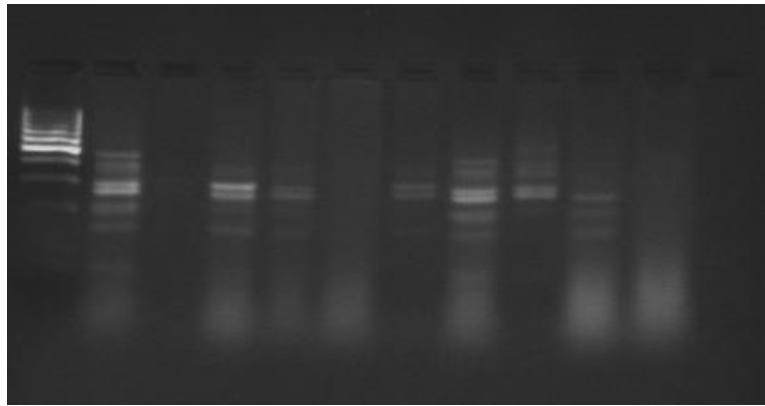


Рис. 1. Приклад електрофоретичного розділення ампліконів отриманих з допомогою ISSR-ПЛР. 1 – маркер молекулярної маси; 2 – 11 – представники роду *Salix*.

На основі отриманого розподілу (рис. 1), складаємо матрицю (табл. 1.) у якій наявність фрагменту позначаємо 1 а відсутність 0, як описано в методичних вказівках «Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях».

Таблица 1.

Матриця отриманих ампліконів зразків рослин

Зразки рослин	Локуси						
1	1	1	1	0	0	0	0
2	1	1	1	0	0	0	0
3	1	1	1	1	0	0	0
5	0	0	0	0	1	1	1

За матрицею розраховують індекс специфічності праймеру, очікувану гетерозиготність, а на основі даних по декількох праймерах розраховують маркерний індекс для оцінки загальної ефективності використаних маркерів. Одним з критеріїв, що характеризує ступінь ідентифікованої мінливості у популяції та відповідно спроможність маркера визначати різницю між генотипами, є PIS (polymorphism information content) – індекс поліморфності локусу. Цей показник розраховується для кожного конкретного локусу і для монолокусного типу маркерів це буде одне значення, тоді як для полілокусного типу, наприклад RAPD-аналіз, кількість значень



дорівнюватиме кількості досліджених локусів. В такому випадку, на наш погляд, доцільніше наводити середнє значення PIS для певного праймера за усіма дослідженими локусами

### **Статистичні показники для характеристики використаних праймерів**

Для характеристики генетичної структури досліджуваних рослинних вибірок розраховували частоти детектованих алелів та частоти генотипів у межах кожного праймера. Оскільки показник частоти алеля відображає його відносну кількість у досліджуваній вибірці, то зрозуміло, що за домінант/рецесивного успадкування алеля неможливо врахувати гетерозиготи, тоді як за кодомінантного типу враховуються як гомо-, так і гетерозиготи. Таким чином, частоту алеля за домінант/рецесивного успадкування обраховували за формулою:

$$p = \frac{n}{N},$$

де  $n$  – кількість зразків з наявністю певного алеля,  $N$  – загальна кількість зразків [9].

А за кодомінантного успадкування частоти для поліалельної системи розраховували за формулою:

$$q = \frac{2n_x + n_y}{2N},$$

де  $n_x$  – кількість гомозигот за  $x$ -алелем,  $n_y$  – кількість гетерозигот з наявністю  $x$ -алеля та  $N$  – загальна кількість зразків [9].

Індекс поліморфності локусу розраховували за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_u p_{lu}^2,$$

де  $p_{lu}$  – частота  $u$ -того алеля для  $l$  локусу.

Індекс специфічності ( $I_s$ ), що характеризує інформативність праймеру розраховують за формулою:

$$I_s = \lg(P(P+N)/N);$$

де  $P$  – кількість поліморфних смуг,  $N$  – загальна кількість смуг .

Індекс генетичного різноманіття  $Nei$  або теоритичну гетерозиготність ( $He$ ), яка характеризує здатність маркеру визначати різницю між генотипами розраховують за формулою:

$$He = 1 - \sum p_i^2;$$

де  $p_i$  – частота  $i$ -того алеля.

Маркерний індекс ( $MI$ ) розраховують за формулою:

$$MI = nHav;$$

де  $n$  – середнє значення кількості поліморфних смуг для всієї системи маркерів,  $Hav$  – середнє значення очікуваної гетерозиготності.