

Оригинальные работы

УДК 575.22:633.791

Ю.М. СИВОЛАП, О.О. ЗАХАРОВА, Н.Е. КОЖУХОВА,
С.О. ІГНАТОВА, М.С. ПРИСТАВСЬКИЙ, Г.А. ЗЕЛЕНІНА

Південний біотехнологічний центр в рослинництві
Національної академії аграрних наук України, Одеса
E-mail: genom2006@mail.ru

СУЧАСНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ В ОЦІНЦІ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (*HUMULUS LUPULUS* L.)



Оцінка генетичного різноманіття генофонду хмелю за ДНК-типунням високоваріабельних мікросателітних локусів та оптимізація умов введення різних генотипів в культуру in vitro є важливим етапом на шляху формування національних сортових ресурсів, основою сучасного розсадництва та засобом захисту власності на сорт, а також необхідна для розробки молекулярних методів добору садивного матеріалу, вільного від патогенів.

© Ю.М. СИВОЛАП, О.О. ЗАХАРОВА, Н.Е. КОЖУХОВА,
С.О. ІГНАТОВА, М.С. ПРИСТАВСЬКИЙ, Г.А. ЗЕЛЕНІНА, 2010

Вступ. Хміль звичайний (*Humulus lupulus* L.) – важлива технічна культура, незамінна сировина для виробництва пива. При переробці хмелю за спеціальними технологіями одержують речовини для хімічної, парфумерної й харчової промисловості. Хміль є багатоцільовою культурою, унікальною та своєрідною за своїм використанням [1].

Орієнтиром для селекційних досліджень у хмелярстві є ринковий попит на сировину з відповідними критеріями якості. У реєстр сортів рослин України на 2010 р. занесено 21 сорт хмелю. Сортова ідентифікація хмелю є гострою проблемою селекції й розсадництва [2].

Традиційно сорти хмелю ідентифікують за морфологічними, біохімічними та господарськими ознаками [3, 4], прояв яких залежить від фази розвитку та віку рослини, екологічних та агрохімічних чинників. До особливостей традиційної ідентифікації хмелю можна віднести тривалість аналізу – від кількох місяців до декількох років. Недостатня розпізнавальна здатність традиційних методів диференціації та ідентифікації сортів хмелю стимулює розробку нових сучасних підходів, зокрема, заснованих на аналізі мінливості геному і специфічності генотипів за допомогою молекулярних маркерів [5].

Найбільш відповідають завданню ідентифікації так звані мікросателітні, або SSR-маркери (simple sequence repeats), інтерсперсовані елементи еукаріотичних, прокаріотичних і еубактеріальних геномів. Мікросателітні повтори встановлено у геномі хмелю та продемонстровано їх придатність для оцінки молекулярно-генетичного поліморфізму цієї культури [6, 7]. Проведено широкомасштабну ізоляцію мікросателітних послідовностей геному хмелю. Створено GA- та GT-бібліотеки клонів із рівнем збагачення 37 і 35 % відповідно; 100 % клонів містили мікросателітні послідовності. Показано наявність мікросателітних повторів у кодуючих послідовностях, нетранслюючих регіонах, інтронах [8].

Південним біотехнологічним центром в рослинництві розроблено принципи й методологію ідентифікації та оригінальну систему реєстрації сортів сільськогосподарських культур за допомогою геномних маркерів [9]. Спроба провести ДНК-ідентифікацію сортів хмелю залишила багато питань [10].

Одержання високоякісного садивного матеріалу хмелю потребує використання прогресив-

них технологій розмноження. Сучасною біотехнологією є клональне мікророзмноження рослин *in vitro* [11], переваги якої – високий коефіцієнт розмноження, скорочення термінів селекції, отримання вільного від фітопатогенів садивного матеріалу, висока рентабельність, цілорічне розмноження, мініатюризація процесу, невеликі лабораторні площі. Технологія клонального мікророзмноження дозволяє одержувати високоякісний садивний матеріал, вільний від внутрішньої інфекції (грибкові захворювання, віруси, бактеріальний рак, мікоплазми). Вирощені таким способом саджанці мають добре розвинену кореневу систему, високий відсоток приживлюваності, раніше вступають до плодоношення. Саме таким матеріалом закладають хмільники такі лідери хмелярства, як Чехія, Німеччина та ін. На теперішній час альтернативи такому способу одержання високоякісного садивного матеріалу немає [12].

Згідно з методичними рекомендаціями щодо розсадництва хмелю *in vitro*, затвердженими спільним наказом № 689/119 Міністерства аграрної політики України та Української академії аграрних наук від 23.10.2008 р. [13], визначено основні етапи: добір рослин-донорів; вирощування, підготовка та виділення експлантів, їх поверхнева стерилізація; культивування експлантів на живильному середовищі *in vitro* (стимуляція розвитку рослин, мікроживцювання пагонів та їх вкорінення); вирощування отриманих рослин-регенерантів в умовах захищеного ґрунту; дорощування рослин-регенерантів до стандартних саджанців у відкритому ґрунті (не пізніше третьої декади червня з обов'язковим використанням хмелешпалер).

Мета даної роботи полягала в оцінці генетичного різноманіття генофонду хмелю за допомогою мікросателітних маркерів та оптимізації умов клонального мікророзмноження.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження слугували 14 сортів хмелю (*Humulus lupulus* L.) (по 20 зразків кожного сорту), надані Інститутом сільського господарства Полісся УААН: Альта, Гайдамацький, Промінь, Зміна, Заграва, Славянка, Кумир, Пивовар, Житомирський 75, Оболонський, Клон 18, Граніт, Хмелеслав, Національний.

Виділення ДНК здійснювали із 50–100 мг бруньок чи коріння згідно з протоколами № 1

[14] та № 2 [15]. Концентрацію виділеної ДНК визначали на флюорометрі «ТКО 100 Dedicated mini Fluorometer» («Hoefler Scientific Instruments», США) у TNE-буфері – 10 мМ Трис-НCl (рН 8,0), 1 мМ Na₂ ЕДТА (рН 8,0), 0,2 М NaCl – у присутності флуоресцентного барвника Hoechst 33258 згідно з інструкцією користувача обладнання.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили у 0,5 мл-мікропробірках на приладі ТП4-ПЦР01 «Терцик» («ДНК-технологія», РФ). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 10 × ПЛР-буфер, 0,2 мМ кожного dNTP, прямий та зворотний праймери (табл. 1), ДНК та ДНК-полімераза Таq.

Електрофоретичний розподіл нативної ДНК здійснювали в 0,8%-них горизонтальних «підводних» агарозних гелях у TBE-буфері при постійній напрузі 80 В і кімнатній температурі та візуалізували забарвленням бромистим етидієм (1 мкг/мл). Гелеві пластини фотографували з використанням світлофільтра ОС-12 в ультрафіолетовому світлі (300 нм) на плівку «Свема-64» (АК «Свема», Україна).

Продукти ПЛР (5 мкл) фракціонували у 6%-ному поліакриламідному гелі у TBE-буфері при постійній напрузі 500 В і температурі 60 °С 1–3 год залежно від довжини фрагментів ампліфікації в апараті для вертикального гелеелектрофорезу. Візуалізацію проводили імпрегуванням гелевих пластин нітратом срібла. Відеозображення електрофоретичних профілів й оцінку довжини продуктів ампліфікації отримували за допомогою системи документування і аналізу гелів «Image Master VDS» («Amersham Pharmacia Biotech», США).

Встановлення генетичних дистанцій згідно з коефіцієнтом SM і графічну побудову дендрограми на основі даних електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «TREE v. 4.0» [16].

Рівень поліморфізму оцінювали у відсотках як відношення поліморфних ПЛР-ампліконів до загального числа ПЛР-ампліконів

$$P = n_p/n_p + n_{np} \cdot 100 \%,$$

де n_p – число поліморфних ПЛР-ампліконів, n_{np} – число неполіморфних ПЛР-ампліконів.

Молекулярні маркери для дослідження геному хмелю

SSR-локус	Кількість алелів	Індекс поліморфності	Довжина алелів, п. н.	Послідовність праймерів (5'-3')	
				прямого	зворотного
HIGA3	4	0,84	146, 152, 154, 156	tttcaccaaatccaagtgc	ggtgccaaggatagacat
HIGA4	7	0,75	220, 222, 228, 230, 232, 236, 240	ccaacactagggtttgcatc	aggctcatcccagaagtatg
HIGA9	4	0,80	193, 201, 215, 217	caaacctaggaacagagtcaagt	ccaacgtaagcaaccaac
HIGA29	3	0,55	180, 186, 196	tcctctcattttttcacacc	tcgggctgataatggta
HIGT1	5	0,40	252, 260, 262, 264, 274	cttggaggaaataatggct	aacatctcacttctctccctaa
HIGT2	5	0,87	212, 214, 216, 218, 220	gtccttcgagcaaaccttata	tcacccttatgcccaatt
HIGT4	4	0,87	197, 201, 203, 231	tggtagttattttgattctgtgc	gcaatattatcagaagcagaagc
HIGT5	7	0,94	203, 204, 210, 212, 219, 220, 286	atacccctctgttttctacc	cgtcgggtccaagaggatt
HIGT9	3	0,53	192, 200, 208	tactgggctctccaatag	ctgtaaaaaggaaagagcagg
HIGT10	2	0,67	229, 231	gtaacatgatagcatcagcc	tgttcccttgttttctacc

Результати досліджень та їх обговорення. Добір високополіморфних мікросателітних локусів. Джерелами для пошуку інформації щодо мікросателітних послідовностей слугували міжнародні електронні бази даних генетики рослин [17–21]: база даних Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information, NCBI) – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; база даних геномів рослин PlantGDB – <http://www.plantgdb.org/>; інші: <http://www.chem.qmw.ac.uk>, <http://www.fastlane.nsf.gov>, <http://www.genome.arizona.edu/fpc/>.

Для дослідження сортів української селекції за критеріями локалізації на різних хромосомах та високим дискримінаційним потенціалом обрано тест-панель із 10 мікросателітних локусів (табл. 1). Для даних маркерів характерна висока розподільча здатність виявлення від 2 до 25 алелів зі середньою кількістю алелів на локус 8,2 і середнім значенням очікуваної гетерозиготності 0,70.

Оптимізація умов ампліфікації ДНК хмелю. Отримання адекватних продуктів ПЛР за молекулярною масою та інтенсивністю обумовлено збалансованістю компонентів реакційної суміші, співвідношення складових частин якої залежить від сайтів праймування ДНК-матриці та якості Таq-полімерази. Оптимізували параметри ПЛР шляхом варіювання:

1) складом реакційного ПЛР-буфера – № 1 (0,02 М Трис-НСl рН 8,4; 0,05 М КСl; 0,01 % Твін-20) і № 2 (0,01 М Трис-НСl рН 8,3; 0,05 М КСl);

2) концентрацією іонів магнію – 1,0, 1,5, 2,5, 3,0 мМ;

3) концентрацією праймерів – 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 мкМ;

4) кількістю Таq-полімерази – 1,0, 2,0, 3,0, 3,5 одиниць на реакцію;

5) концентрацією ДНК – 20, 40, 60, 80, 100 нг;

6) температурою відпалювання праймерів 53, 54, 55, 57, 60, 62 °С;

7) кількістю циклів ПЛР – 25, 26, 28, 29.

Результати оптимізації умов ПЛР наведено у табл. 2.

Диференціація генотипів хмелю. Проведено мікросателітний аналіз 14 сортів хмелю за допомогою ПЛР із використанням добраних мікросателітних маркерів. На рис. 1 наведено електрофореграму продуктів ампліфікації досліджених локусів для сорту Національний.

Для визначення типовості й однорідності сортів здійснювали порівняльний аналіз спектрів ампліфікованої ДНК у межах сорту за чотирма мікросателітними локусами – 11a59, 7a82, 3a88, 5–2, обраними як найбільш поліалельні за літературними даними. Тестували ДНК кожного сорту, виділену з бруньок індивідуальних живців. Сорти вважали однорідними, якщо спектри ДНК зразків сорту були однаковими за дослідженими мікросателітними локусами.

У результаті ПЛР-аналізу генотипів хмелю виявлено, що діапазон довжин алелів досліджених мікросателітних локусів варіював у ме-

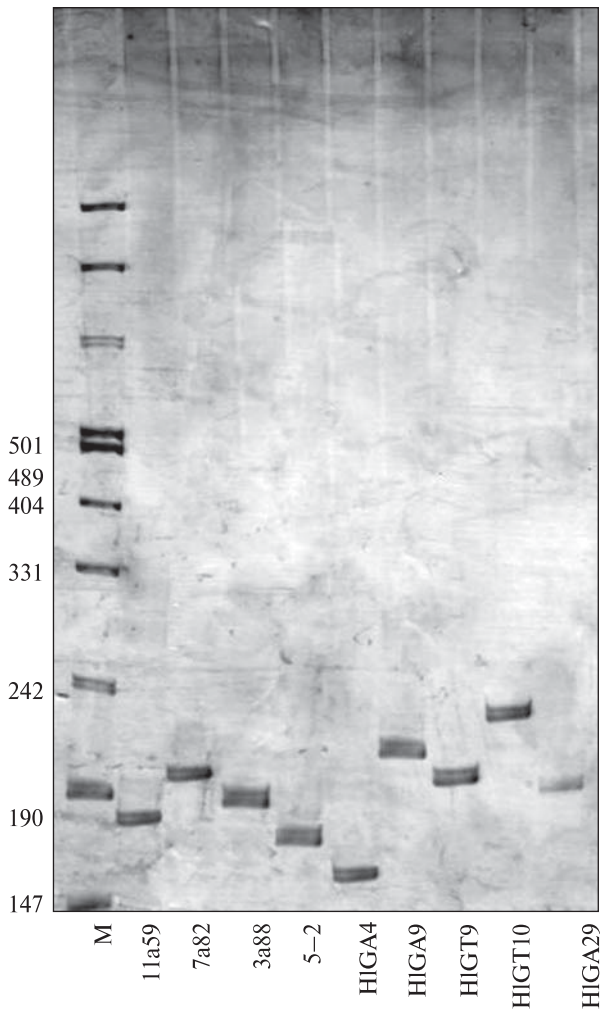


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації мікросателітних локусів 11a59, 7a82, 3a88, 5–2, HIGA4, HIGA9, HIGT9, HIGT10, HIGA29 сорту Національний. М – маркер молекулярної маси pUC 19/MspI

жах від 178 до 232 п.н. Кількість алелів на локус варіювала від 1 до 5, що є меншим, ніж наведено в літературі при використанні даної маркерної панелі (від 2 до 25 алелів). Це свідчить про відносну однорідність генотипів вітчизняної селекції у порівнянні з країнами інших еколого-географічних регіонів. Слід зазначити, що досліджені сорти хмелю є гібридного походження, де в гетерозиготі представлено декілька алелів. Вегетативне розмноження дозволяє вирощувати рослини в гетерозиготному стані і, таким чином, підтримувати типовість сорту.

Таблиця 2
Оптимізація умов ПЛР-ампліфікації ДНК хмелю

Параметри	Результати оптимізації для праймерів				
	HIGT1 F/R	HIGT2 F/R	11a59 F/R, 7a82 F/R, 3a88 F/R, 5–2 F/R, HIGA4 F/R, HIGA9 F/R, T9 F/R, HIGT10 F/R	HIGA29 F/R, HIGT4 F/R	HIGA3 F/R, HIGT5 F/R
Склад ПЛР-буфера					
№ 1	+	+	+	+	+
№ 2	-	-	-	-	-
Концентрація іонів магнію, мМ					
1,0	-	-	-	-	-
1,5	-	-	-	-	-
2,5	+	+	+	+	+
3,0	-	-	-	-	-
Концентрація праймерів, мкМ					
0,2	-	-	-	-	-
0,4	-	-	-	-	-
0,6	+	+	+	+	+
0,8	-	-	-	-	-
1,0	-	-	-	-	-
Кількість Taq-полімерази, од.					
1,0	-	-	-	-	-
2,0	+	+	+	+	+
3,0	-	-	-	-	-
3,5	-	-	-	-	-
Концентрація ДНК, нг					
20	-	-	-	-	-
40	+	+	+	+	+
60	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-
Температура відпалювання праймерів, °С					
53	+	-	-	-	-
54	-	+	-	-	-
55	-	-	+	-	-
57	-	-	-	+	-
60	-	-	-	-	+
Кількість циклів ПЛР					
25	-	-	-	-	-
26	-	+	+	+	-
28	+	-	-	-	-
29	-	-	-	-	+

Примітки. «+» – наявність продуктів ПЛР; «-» – відсутність ампліфікації.

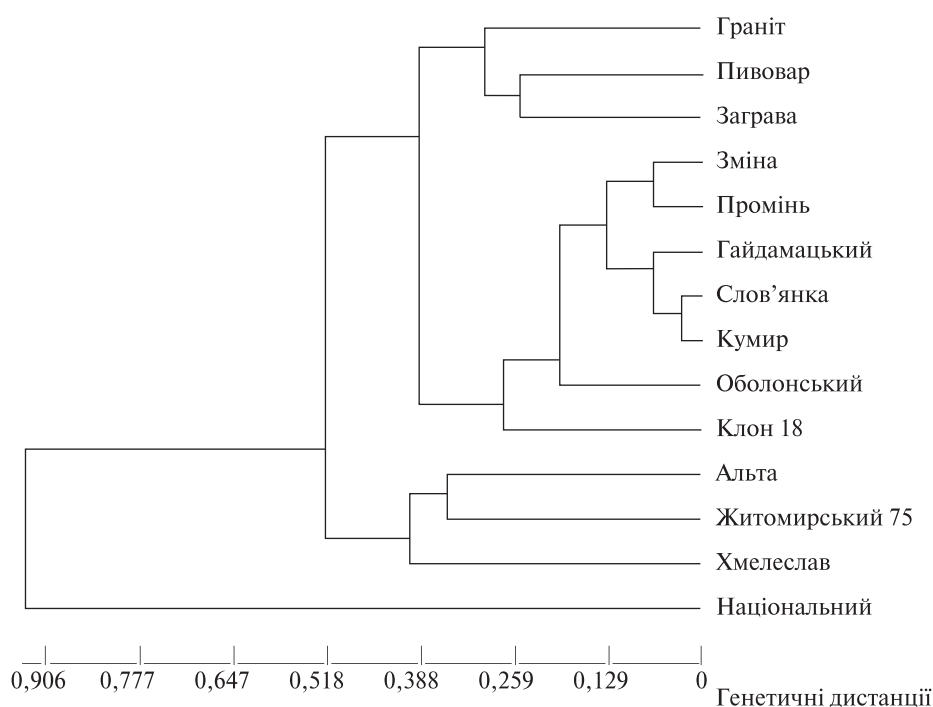


Рис. 2. Дендрограма феногенетичних відносин сортів хмелю

Виявлено наявність унікальних фрагментів ампліфікації ДНК у деяких сортів хмелю, а саме: по два фрагменти у сортів Граніт (197 п.н. у локусі HIGT4, 200 п.н. у локусі 3a88) і Хмелеслав (182 п.н. у локусі 5–2, 208 п.н. у локусі HIGT9) та по одному фрагменту у сортів Клон 18 (локус HIGT5 – 193 п.н.), Житомирський 75 (локус 5–2 – 178 п.н.). У цих сортів, крім Житомирського 75, виявлено унікальну відсутність алелів у порівнянні з іншими генотипами вибірки: у сорту Граніт відсутній фрагмент ампліфікації в 195 п.н. локусу HIGT4, у сорту Хмелеслав – в 200 п.н. HIGT9, у сорту Клон 18 – в 194 п.н. 11a59.

Рівень молекулярно-генетичного поліморфізму сортів у межах вибірки становив 96,6 %.

За допомогою комп'ютерної програми «TREE v.4.5» побудовано дендрограму феногенетичних відносин сортів хмелю (рис. 2).

На дендрограмі виділено три кластери: перший кластер об'єднує сорти хмелю Граніт, Пивовар, Заграва; другий – Гайдамацький, Промінь, Зміна, Слов'янка, Кумир, Оболонський, Клон 18; третій – Альта, Житомирський 75, Хмелеслав. Окремою гілкою розташовано сорт

Національний, що свідчить про використання відмінної від аналізованих українських сортів зародкової плазми при створенні цього сорту.

ПЛР-аналіз мікросателітних локусів дозволив отримати індивідуальні для кожного генотипу набори алелів мікросателітних локусів (табл. 3).

Реєстрація сортів хмелю. Інформація щодо алейного складу мікросателітних локусів дозволяє фіксувати генотипи у вигляді генетичної літеро-цифрової формули. Принципову схему реєстрації генотипів важливих сільськогосподарських культур, що розроблена у Південному біотехнологічному центрі, використано для реєстрації сортів хмелю. Літера означає код локусу, нижній індекс – розмір алелів, отриманих для даного локусу. У табл. 4 наведено генетичні формули генотипів хмелю.

Для зберігання даних ПЛР-аналізу мікросателітних локусів та генетичних формул створено базу даних ДНК-типуння сортів хмелю на основі системи управління базами даних ORACL 10gXE із можливістю web-доступу. Створення такої бази пов'язано з необхідністю зберігання інформації щодо генетичного різно-

Алелі мікросателітних локусів сортів хмелю

Локус	Код локусу	Граніт	Пивовар	Альга	Зміна	Промінь	Обо-лонський	Гайда-мацький	Хмеле-слав	Слов'ян-ка	Кумир	Клон 18	Жито-мирський 75	Заграва	Націо-нальний
11a59	A	184, 194	184, 194	194	184, 194	184, 194	184, 194	184, 194	184, 194	184, 194	184, 194	184	194	184, 194	180
7a82	B	200	200	198	200	200	200	200	198	200	200	200	200	200	196
3a88	C	196, 200	196, 198	194	194	194	192	194	194	194	194, 198	192	194	192, 196	186
5-2	D	180, 186	180, 186	186	180	180	180	180	182	180	180	180	178	180, 186	173
HIGA29	E	196	196	186	186	196	186, 196	186, 196	186, 196	196	196	186, 196	186	196	192
HIGA4	F	232	228	228, 230	232	232	232	228, 232	232	232	232	232	232	230	163
HIGA9	G	201	215	201	215	215	215	217	201	217	217	217	201, 217	217	206
HIGT4	H	197	195	195	195	195	195	195	195	195	195	195	195	195	139
HIGT5	I	204, 208	204, 208	204	204, 208	204, 208	208	204, 208	204, 208	204, 208	204, 208	193	204	208	208, 246
HIGT9	J	200	200	200	200	200	200	200	208	200	200	200	200	200	194

маніття, тестування новизни генотипів – кандидатів на реєстрацію, а також оцінкою відповідності еталонному зразку.

Таким чином, сортова специфічність досліджених сортів хмелю зареєстрована в базі даних у вигляді генетичних формул, що надають можливість проведення ідентифікації зразків зі спірним походженням, нових генотипів, верифікації садивного матеріалу, а також є необхідними для захисту авторських прав селекціонерів.

Опрацювання умов введення хмелю в культуру in vitro. Дослідження спрямовані на добір оптимального складу гідропонних розчинів для вирощування донорних рослин, режиму поверхневої стерилізації експлантів, складу макро- і мікроелементів живильних середовищ з метою одержання високожиттєздатних експлантів і рослин-регенерантів.

Для отримання донорних рослин відбирали вирощені в польових умовах кореневища хмелю розміром 10–15 см із 2–4 добре розвинутими бруньками. Висаджували в третій декаді січня, вирощували рослини-донори гідропонним способом у контейнерах об'ємом 0,75 л, субстратом була суміш верховий торф : перліт (1:1), рН 5,5 в умовах культурального приміщення при температурі 20–22 °С, освітленні 2300 лк, 16-годинному фотоперіоді.

Склад живильного розчину для гідропонної культури збалансований за макро- і мікроелементами з урахуванням біологічної потреби хмелю у даних елементах (мг/л), а саме: NO_3^- – 140,0; NH_4^+ – 20,0; P^- – 40,0; K^+ – 165,0; Ca^{2+} – 170,0; Mg^{2+} – 45,0; SO_4^{2-} – 80,0; Fe^{2+} – 2,1; Mn^{2+} – 0,8; Zn^{2+} – 0,33; B^{3-} – 0,33; Cu^{2+} – 0,15; Mo^- – 0,05. Загальна концентрація мінеральних солей за показником електропровідності розчину – 2,4–2,59 мСм*, рН 5,5–5,7. Вирощені рослини характеризувались інтенсивним ростом та розвитком, не мали зовнішніх ознак уражень хворобами та шкідниками. Після одного місяця вирощування рослин гідропонним способом доцільно один раз у 10 днів проводити промивку субстрату водою рН 5,5–5,7, щоб попереджати засолення.

Для виділення експлантів використовували пагони донорних рослин, приріст яких за мі-

* мСм – міліСімекс, одиниця електропровідності.

сяць складав більше 30 см, із 7–8 міжвузлями, без зовнішніх пошкоджень. Експлантами служили як апікальні, так і пазушні бруньки розміром 0,3–0,8 см. Всі роботи, пов'язані з виділенням бруньок та експлантуванням їх на живильне середовище, проводили в стерильних умовах ламінарного боксу.

Для встановлення оптимального режиму поверхневої стерилізації ініціальних експлантів використовували такі діючі агенти, як 70%-ний етиловий спирт, 15%-ний перексид водню, комерційні засоби «Білизна» та «Доместос» у різних експозиціях.

Поверхнево стерилізовані експланти висаджували на живильне середовище по 5–6 штук в банки типу «TWIST-OFF».

Базовим варіантом живильного середовища для культивування експлантів хмелю була модифікація середовища Мурасиге-Скуга (МС) із додаванням 0,5 мг/л БАП, 1,0 мг/л вітаміну С, 100,0 мг/л мезоінозиту, 10,0 мг/л нікотинової кислоти, 1,0 мг/л піридоксину, 25 мг/л тіаміну, 5,0 мг/л аденіну. Для визначення впливу джерела вуглецю нами було використано два варіанти базового середовища: МС-1 – з додаванням 30 г/л сахарози, МС-2 – 30 г/л глюкози.

Експланти культивували в культуральній кімнаті при температурі 25–26 °С, освітленні 2300 лк, 16-годинниму фотоперіоді. Через 3–5 діб оцінювали ефективність поверхневої стерилізації підрахунком кількості експлантів без візуальних ознак контамінації. Через два тижні підраховували життєздатність експлантів шляхом оцінки непошкоджених експлантів, бруньки яких почали розвиватися.

В результаті проведених досліджень для підвищення життєздатності експлантів запроваджено вирощування донорних рослин хмелю у закритому ґрунті з використанням гідропоніки. Такий спосіб дає можливість знизити накопичення зовнішньої патогенної інфекції. Крім того, використання комплексонатів мікроелементів (хелатів), за нашою думкою, сприяє збалансованому живленню, інтенсивному росту, розвитку донорних рослин та збільшенню концентрації ендогенних гормонів, що, в свою чергу, підвищує життєздатність та регенераційний потенціал експлантів при введенні в культуру *in vitro*. Використання гідропонних технологій також є необхідним елементом у подальшій адаптації та дорощуванні рослин-регенерантів до певних стандартів отриманого садивного матеріалу.

Таблиця 4
Генетичні формули сортів хмелю

Генотип	Формула
Граніт	A _{184,194} B ₂₀₀ C _{196,200} D _{180,186} E ₁₉₆ F ₂₃₂ G ₂₀₁ H ₁₉₇ I _{204,208} J ₂₀₀
Пивовар	A _{184,194} B ₂₀₀ C _{196,198} D _{180,186} E ₁₉₆ F ₂₂₈ G ₂₁₅ H ₁₉₅ I _{204,208} J ₂₀₀
Альта	A ₁₉₄ B ₁₉₈ C ₁₉₄ D ₁₈₆ E ₁₈₆ F _{228,230} G ₂₀₁ H ₁₉₅ I ₂₀₄ J ₂₀₀
Зміна	A _{184,194} B ₂₀₀ C ₁₉₄ D ₁₈₀ E ₁₈₆ F ₂₃₂ G ₂₁₅ H ₁₉₅ I _{204,208} J ₂₀₀
Промінь	A _{184,194} B ₂₀₀ C ₁₉₄ D ₁₈₀ E ₁₉₆ F ₂₃₂ G ₂₁₅ H ₁₉₅ I _{204,208} J ₂₀₀
Оболонський	A _{184,194} B ₂₀₀ C ₁₉₂ D ₁₈₀ E _{186,196} F ₂₃₂ G ₂₁₅ H ₁₉₅ I ₂₀₈ J ₂₀₀
Гайдамацький	A _{184,194} B ₂₀₀ C ₁₉₄ D ₁₈₀ E _{180,196} F _{228,232} G ₂₁₇ H ₁₉₅ I _{204,208} J ₂₀₀
Хмелеслав	A _{184,194} B ₁₉₈ C ₁₉₄ D ₁₈₂ E _{186,196} F ₂₃₂ G ₂₀₁ H ₁₉₅ I _{204,208} J ₂₀₈
Слов'янка	A _{184,194} B ₂₀₀ C ₁₉₄ D ₁₈₀ E ₁₉₆ F ₂₃₂ G ₂₁₇ H ₁₉₅ I _{204,208} J ₂₀₀
Кумир	A _{184,194} B ₂₀₀ C _{194,198} D ₁₈₀ E ₁₉₆ F ₂₃₂ G ₂₁₇ H ₁₉₅ I _{204,208} J ₂₀₀
Клон 18	A ₁₈₄ B ₂₀₀ C ₁₉₂ D ₁₈₀ E _{186,196} F ₂₃₂ G ₂₁₇ H ₁₉₅ I ₁₉₃ J ₂₀₀
Житомирський 75	A ₁₉₄ B ₂₀₀ C ₁₉₄ D ₁₇₈ E ₁₈₆ F ₂₃₂ G _{201,217} H ₁₉₅ I ₂₀₄ J ₂₀₀
Заграва	A _{184,194} B ₂₀₀ C _{192,196} D _{180,186} E ₁₉₆ F ₂₃₀ G ₂₁₇ H ₁₉₅ I ₂₀₈ J ₂₀₀
Національний	A ₁₈₀ B ₁₉₆ C ₁₈₆ D ₁₇₃ E ₁₉₂ F ₁₆₃ G ₂₀₆ H ₁₃₉ I _{208,246} J ₁₉₄

шуванні рослин-регенерантів до певних стандартів отриманого садивного матеріалу.

Оптимальним строком відбору експлантів усіх досліджених сортів для введення в культуру *in vitro* є березень–травень. Впродовж інших сезонів розвиток експлантів відбувався повільно.

Розроблено режим поверхневої стерилізації експлантів з витриманням у 0,5%-ному розчині комерційного препарату «Доместос» протягом 15 хв із подальшою нейтралізацією дії агенту в 0,01 н розчині HCl 5 хв та промиванням експлантів 3–4 рази у автоклавованій дистильованій воді. За цим режимом вихід експлантів, вільних від поверхневої інфекції, становив у середньому 82,5 % загальної кількості експлантів. Діючий агент «Доместосу»,

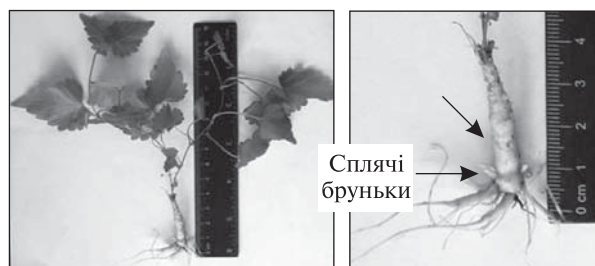


Рис. 3. Саджанець хмелю сорту Альфа, отриманий шляхом клонального мікророзмноження (55 діб від введення в культуру *in vitro*)

гіпохлорит натрію, є досить сильнодіючою клітинною отрутою, тому, щоб запобігти пошкодженню експлантів, рекомендується використовувати для нейтралізації негативної дії 0,01 н розчин HCl . Збільшення експозиції у

Таблиця 5
Біометричні показники розвитку експлантів хмелю в залежності від джерела вуглецю у складі живильного середовища

Генотип хмелю	Висота надземної частини регенерантів, см		Довжина кореневої системи регенерантів, см	
	МС-1	МС-2	МС-1	МС-2
Заграва	$0,3 \pm 0,05$	$4,5 \pm 0,6$	0	$0,2 \pm 0,04$
Слов'янка	0	$3,9 \pm 0,4$	0	$0,5 \pm 0,08$
Потієвський	0	$3,6 \pm 0,3$	0	$0,7 \pm 0,09$
Клон 18	$0,7 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,04$	$0,8 \pm 0,2$

«Доместосі» до 20 хв призводило до сильних опіків тканин експланта, що в свою чергу зменшувало їхню життєздатність.

Використання розчину хлорного відбілювача «Білизна» з подальшим промиванням експлантів 3–4 рази в автоклавованій дистильованій воді менш ефективно. За цим режимом було одержано у середньому 50,5 % експлантів, вільних від поверхневої інфекції. Зниження виходу таких експлантів пов'язане скоріш за все з тим, що активний хлор, який входить до складу препарату, має здатність швидко випаровуватись, тому необхідно визначати концентрацію діючої речовини, що ускладнює дослідження. Збільшення концентрації хлорного відбілювача та експозиції обробки теж призводить до сильного ушкодження тканин експланта та зниження його життєздатності. Використання як стерилізуючих агентів для експлантів хмелю етилового спирту чи пероксиду водню виявилось неефективним. Позбавити експланти від поверхневої інфекції не вдалось.

Встановлено, що кращим варіантом живильного середовища для більшості досліджених сортів є варіант із використанням глюкози як джерела вуглецю (табл. 5). На середовищі з додаванням сахарози МС-1 експланти, за виключенням Клону 18, погано розвивалися, у подальшому рееструвалися ознаки хлорозу та загибель експлантів.

Можливо, що при інверсії сахарози утворюється фруктоза, яка має сильні комплексо-

Таблиця 6
Перелік фітопатогенів та послідовності праймерів для ПЛР-детекції

Збудник (хвороба)	Послідовність праймерів (5'-3')	
	прямого	зворотного
Гриби		
<i>Pseudoperonospora humuli</i> (несправжня борошниста роса)	ctgaggggacgaaaggctctg	ctggtcacatggacagccttca
<i>Podosphaera macularis</i> (борошниста роса)	cccgaactcatgtagttagtgc	gagcacatcggtagcccaacta
Віруси		
<i>Hop mosaic virus</i> (міжжилкова мозаїка хмелю)	agtggctactctcgtctcattt	ttacaagcaacttgaggagataac
<i>Apple mosaic virus</i>	ctggttgggaccgctgggac	gactcgtcgtcgacgaagggtc
<i>Hop leaf roll virus</i> (скручування листя хмелю)	ccaccgggtagtttccaact	atacaactcttgagcgccga
<i>Hop latent virus</i>	gccccggggctctttctcaggttaag	ggcaactcttctcagaatcc
Бактерії		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (бактеріальний рак)	gatcgggtccaatgctgt	gatatccatgatctctt

утворювальні властивості, що призводить до порушення іонного балансу у живильному середовищі. Також, можливо, концентрація сахарози є досить високою. Добір оптимальної концентрації сахарози та з'ясування її впливу на синергізм та антагонізм іонів у живильному середовищі буде метою наших наступних досліджень. На середовищі з додаванням глюкози МС-2 експланти всіх досліджених сортів хмелю характеризувались нормальним морфогенезом і найбільшими показниками росту. У експлантів спостерігали калюсогенез із наступним ризогенезом.

Слід зазначити, що Клон 18 виявив високі морфогенетичні властивості на обох варіантах середовищ МС-1 і МС-2. Пропонуємо у подальших дослідженнях використовувати Клон 18 як показник регенераційної здатності експлантів хмелю.

Кращим джерелом вуглецю у складі живильного середовища для культивування експлантів хмелю сортів Заграва, Слов'янка, Потієвський є глюкоза, для Клону 18 можливе використання також сахарози.

Після мікророзмноження адаптовані рослини-регенеранти дорощували в контейнерах. На рис. 3 показано саджанець хмелю сорту Альга. Добре розвинена коренева система, достатня кількість сплячих бруньок, наявність довгої кореневої шийки є ознаками нормального морфогенезу.

Додаткові етапи до загальної схеми клонального мікророзмноження. В останні роки нарощування темпів виробництва пивоварної, фармацевтичної, парфумерної галузей призвело до різкого збільшення процесів створення нових хмільників та реанімації старих, виникнення нагальної потреби забезпечення господарств великою кількістю високоякісного, вільного від внутрішньої інфекції садивного матеріалу. У зв'язку з цим пропонуємо додати до загальновідомих етапів клонального мікророзмноження додаткові:

а) скринінг донорного матеріалу на наявність вірусної, бактеріальної та грибової інфекції за допомогою молекулярних маркерів (табл. 6) та добір вільного від фітопатогенів матеріалу;

б) ДНК-ідентифікація генотипу перед введенням у культуру *in vitro*;

в) повторний контроль за допомогою молекулярних маркерів ураженості експлантів в процесі розмноження *in vitro* та перед переведенням у закритий ґрунт;

г) тестування ґрунту маточних розсадників на наявність фітопатогенів за допомогою молекулярних маркерів та визначення захисних заходів.

Висновки. Оптимізовано умови екстракції ДНК (із бруньок та коріння хмелю): склад буфера, що лізує, тривалість інкубації та температурний режим. Визначено умови проведення ПЛР шляхом варіювання складу реакційного буфера, концентрацією іонів магнію, праймерів, ДНК-полімерази, ДНК, температурними режимами, кількістю циклів ампліфікації. Додано панель десяти мікросателітних маркерів із високим дискримінаційним потенціалом. За ПЛР-тестуванням мікросателітних локусів сорти мають гібридне походження. Виявлено індивідуальні для кожного генотипу набори алелів мікросателітних локусів, що відображено у генетичних формулах сортів. Створено базу даних ДНК-типуювання генотипів хмелю. Попереднє вирощування донорних рослин доцільно проводити способом гідропоніки з використанням живильного розчину, специфічного за складом, який дозволяє знизити накопичення зовнішньої патогенної інфекції, сприяє інтенсивному росту, розвитку донорних рослин та збільшенню концентрації ендогенних гормонів, що підвищує життєздатність та регенераційний потенціал експлантів при введенні в культуру *in vitro*. Визначено оптимальний термін (березень–травень) відбору експлантів хмелю всіх досліджених сортів для введення в культуру *in vitro*. Для поверхневої стерилізації експлантів хмелю всіх досліджених сортів необхідно витримувати їх 15 хв у 0,5%-ному розчині препарату «Доместос», нейтралізувати дію агента в 0,01 н розчині HCl протягом 3 хв та промивати експланти 3–4 рази у автоклавованій дистильованій воді. Кращим джерелом вуглеводів у складі живильного середовища для культивування експлантів хмелю сортів Заграва, Слов'янка, Потієвський необхідна глюкоза, для Клону 18 можливе використання сахарози. Розроблено додаткові етапи клонального мікророзмноження: скринінг донорного матеріалу на наявність вірусної, бактеріальної та грибової інфекції за

допомогою молекулярних маркерів; ДНК-ідентифікація генотипу перед введенням в культуру *in vitro*; повторний контроль за допомогою молекулярних маркерів ураженості експлантів в процесі розмноження та перед переведенням у закритий ґрунт; тестування ґрунту маточних розсадників на наявність фітопатогенів за допомогою молекулярних маркерів та визначення захисних заходів.

*Yu. Sivolap, O. Zakharova, N. Kozhukhova,
S. Ignatova, N. Pristavski, G. Zelenina*

MODERN BIOTECHNOLOGIES
IN ESTIMATION OF GENETIC
DIVERSITY OF UKRAINIAN HOP VARIETIES
(*HUMULUS LUPULUS* L.)

Genetic variety estimation of hop gene pool using DNA-typing of highly polymorphic microsatellite loci and optimization of introduction to the culture of *in vitro* conditions is the important stage of national varieties resources forming, basis of modern nursery and protect mean of varieties property, and also it is necessary for development of molecular methods of selection of planting-stocks free from pathogens.

*Ю.М. Сиволап, О.О. Захарова, Н.Э. Кожухова,
С.А. Игнатова, Н.С. Приставский, Г.А. Зеленина*

СОВРЕМЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ
В ОЦЕНКЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
УКРАИНСКИХ СОРТОВ ХМЕЛЯ
ОБЫКНОВЕННОГО (*HUMULUS LUPULUS* L.)

Оценка генетического разнообразия генофонда хмеля с помощью ДНК-типирования высоковариабельных микросателлитных локусов и оптимизация условий введения различных генотипов в культуру *in vitro* является важным этапом формирования национальных сортовых ресурсов, основой современного питомниководства и средством защиты собственности на сорт, а также необходима для разработки молекулярных методов отбора посадочного материала, свободного от патогенов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костриця М.Ю., Рейтман Й.Г. Хміль та пиво в Україні з давнини до сьогодення / Житомир. наук.-краєзнавче т-во дослідників Волині, Інститут сільськогосподарства Полісся. — Житомир, 1997. — 240 с.
2. Гладких О., Штанько І. Українське хмелярство: стан та перспективи // Пропозиція. — 2009. — № 2. — С. 58–68.
3. Жигало Ю.В. До методики ідентифікації сортів хмелю (*Humulus lupulus* L.) за морфологічними ознаками // Хмелярство. — 2005. — Вип. 22. — С. 17–25.

4. Полищук І.Б., Заграфова М.Й. Метод добору вихідного селекційного матеріалу хмелю за кількістю лупулінових зерен на генеративних органах // Хмелярство : Міжвід. тем. наук. зб. — К.: Урожай, 1986. — Вип. 8. — С. 12–15.
5. Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. Fingerprinting in Plants : Principles, Methods and Applications. 2 ed. — CRC Press Taylor and Francis Group, 2005. — 470 p.
6. Jakse J., Javornik B. High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.) // Plant Mol. Biol. Rep. — 2001. — **19**. — P. 217–226.
7. Jakse J., Satovic Z., Javornik B. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.) // Genome. — 2004. — **47**. — P. 889–899.
8. Cerenak A., Jakse J., Javornik B. Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers // J. Amer. Soc. Brew. Chem. — 2004. — **62**, № 1. — P. 1–7.
9. Сиволап Ю.М., Волкодав В.В., Бальвінська М.С., Кожухова Н.Е., Солоденко А.Є., Чеботар С.В. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу микросателітних локусів : Метод. рекомендації. — Одеса, 2004. — 14 с.
10. Мельничук М.Д., Оверченко В.В., Спиридонов В.Г., Парій М.Ф. Ідентифікація генотипів хмелю (*Humulus lupulus* L.) за микросателітними маркерами // Наук. доп. НАН України. — 2008. — № 4 (12). — С. 1–12.
11. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. — М.: Наука, 1983. — 96 с.
12. Калинин В.Л., Кушнир Г.П., Сарнищкая В.В. Технология микрклонального размножения растений / Отв. ред. В.П. Лобов — К.: Наук. думка, 1992. — 232 с.
13. Методичні рекомендації щодо ведення розсадництва хмелю / Міністерство аграрної політики України та Українська академія аграрних наук. Наказ № 89/119 від 23.10.2008 р.
14. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. — 1987. — **19**. — P. 11–15.
15. Krizman M., Jakse J., Baricevic D. Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction // Acta agricult. Sloven. — 2006. — **87**. — P. 427–433.
16. Календарь Р. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофоретических ДНК и белков // Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений : Докл. междунар. конф. — Киев, 1994. — С. 25–26.
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. <http://www.plantgdb.org/>
19. <http://www.chem.qmw.ac.uk>
20. <http://www.fastlane.nsf.gov>
21. <http://www.genome.arizona.edu/fpc/>

Надійшла 21.07.09

А.Н. РАШИДОВ², В.Г. СПИРИДОНОВ²,
О.М. КОНОВАЛ², М.Д. МЕЛЬНИЧУК¹

¹ Національний університет біоресурсів та природокористування
України, Київ

E-mail: arashydov@yahoo.com

² Українська лабораторія контролю та якості продукції АПК України, Київ

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛЬНИХ ВАРИАНТІВ ГЕНІВ МОЛОЧНОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ АНТИПРАЙМЕРА



Представлено два незалежних підходи щодо проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі для SNP детекції генів каппа-казеїну та ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази I у великої рогатої худоби. Проаналізовано зразки від 296 корів молочних порід української селекції. За геном каппа-казеїну отримано наступні частоти генотипів: AA – 0,58, AB – 0,34, BB – 0,08, а за геном ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази I: AA – 0,7, АК – 0,26, КК – 0,04. Показана висока ефективність антипраймерної методики. Термін проведення антипраймерної ПЛР у реальному часі займає лише 2–2,5 год та дозволяє повністю ідентифікувати невідомий алельний варіант досліджуваних генів.

© А.Н. РАШИДОВ, В.Г. СПИРИДОНОВ, О.М. КОНОВАЛ,
М.Д. МЕЛЬНИЧУК, 2010

Вступ. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) широко застосовується в молекулярній діагностиці, біотехнології, а також генетичному аналізі, зокрема, в галузі прикладної ветеринарії. Вперше ця технологія була застосована у 2006 р. для клінічної діагностики раку у людей [2]. Описано модифікацію кількісного ПЛР у реальному часі, що базується на технології 3'-зв'язування, відомій як «антипраймер» [1].

Дослідження генів каппа-казеїну (*csn*) та ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази I (*dgat*) у великої рогатої худоби (ВРХ) має велике значення як з наукової, так і з практичної точки зору, оскільки ці гени кодують білки, що впливають на сиродільчі показники молока та сиру. Казеїни – це група складних фосфопротеїдів (залишок фосфорної кислоти утворює складний ефір з гідроксильною групою серину), які забезпечують високу поживну цінність молока ссавців і складають до 80 % усіх молочних білків [3]. Казеїни містять повний набір незамінних амінокислот, багаті валіном (7 %), лейцином (12 %), лізином (7 %) [4]. Каппа-казеїн є головною детермінантою якості молока та молочних продуктів [5]. Продукт гена каппа-казеїну є також основним ферментом, який відповідає за регуляцію рівня синтезу тригліцеридів в адипоцитах [6].

Нуклеотидна заміна GC → AA в позиціях 10433/10434 призводить до амінокислотної заміни A → K (аланін/лізин) у положенні 232 білка гена *dgat* [7]. Мутація K232A пов'язана з вмістом жиру і білків у молоці: алельний варіант K – з великою кількістю жиру у молоці, алель A – з виходом молока і сумарною концентрацією білків. Ці якісні ознаки залежать від точкових мутацій у вказаних генах, так званих мутацій SNP (single nucleotide polymorphism – однонуклеотидний поліморфізм) [4].

Даний тип мутацій аналізують, використовуючи метод ПЛР – поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Проте у цього методу є ряд недоліків, з яких основний – тривалий час проведення аналізу (від 24 год). Проведення аналізу в 5–6 стадій також збільшує вірогідність помилки оператора та контамінації зразків.

Метод ПЛР в реальному часі з використанням технології «антипраймер» є модифікацією ПЛР у реальному часі, де використовується антипраймер [8]. У звичайній ПЛР в реальному часі використовують зонди – послідовнос-

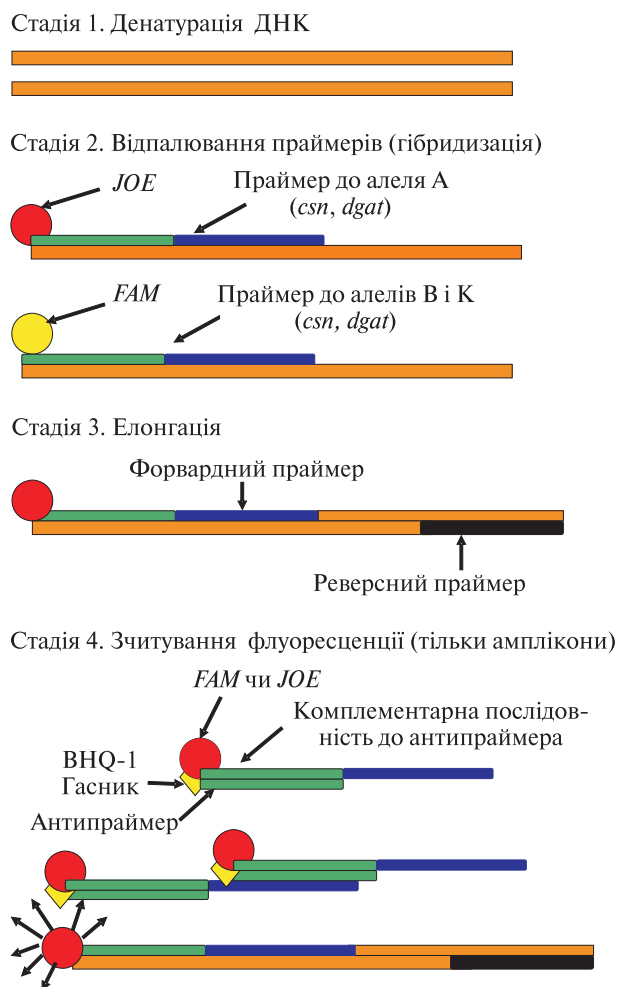


Рис. 1. Схема ПЛР

Таблиця 1

Параметри ампліфікації

Етапи ампліфікації	Температура, °C		Час	Кількість циклів	
	<i>csn</i>	<i>dgat</i>		<i>csn</i>	<i>dgat</i>
Початкова денатурація ДНК	94	94	5 хв	1	1
Денатурація	94	94	15 с	45	40
Відпалювання праймерів	62	64	15 с	45	40
Синтез	72	72	15 с	45	40
Зчитування сигналу	50	50	45 с	45	40

Примітка. Аналіз проведено за допомогою приладу «7000 Sequence Detection System» з активним регулюванням температури при об'ємі рідини в пробірці 25 мкл.

ті, мічені флуоресцентними барвниками, які забезпечують безперервний моніторинг флуоресцентного сигналу. Величина цього сигналу є прямо пропорційною кількості ПЛР-продукту. Модифікація з антипраймером відрізняється у наступному. Кожний праймер складається з послідовності розміром до 40 нуклеотидів, міченої флуоресцентною міткою з 5'-кінця *FAM* та *JOE*. У всіх праймерів є консервативна послідовність, яка починається з 5'-кінця праймера і має розмір 20 нуклеотидів. Антипраймер має на 3'-кінці зв'язаний гасник та послідовність TTCCCTCGGATAGCACT-BHQ-1 [2], повністю комплементарну до 5'-кінця праймерів [9]. Аналіз з використанням методу ПЛР з антипраймером включає чотири послідовні стадії (рис. 1) [1].

Перша стадія починається з денатурації матричної ДНК за умов 94 °C протягом 5 хв. На другій стадії проводять відпалювання праймерів на вже денатурованій матриці при 62–64 °C в залежності від типу аналізу (повна комплементарність ДНК-матриці та комплементарної послідовності до антипраймера стає можливою тільки з другого циклу ампліфікації). На третій стадії – елонгації – відбувається подвоєння кількості існуючих ампліконів при 72 °C. На четвертій стадії температуру проведення реакції знижують до 50 °C (табл. 1). На цій стадії відбувається повна гібридизація усіх незв'язаних праймерів та проходить зчитування сигналу апаратурою [1, 10]. Цей метод є високочутливим, оскільки можна виявити цільову послідовність за умови її зустрічання один раз на 10⁵ клітин.

Метою роботи є визначення порівняльної ефективності ПЛР в реальному часі з використанням антипраймера для аналізу алельних варіантів генів молочної продуктивності корів каппа-казеїну та ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази I.

Матеріали і методи. У наших дослідженнях ми використовували стандартну Taq-Pol виробництва «Fermentas» (Литва). Праймери були синтезовані компанією «СИНТОЛ» (РФ).

Дослідження проводили на 296 дійних коровах української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід ДП ДГ «Прогрес» Чернігівського інституту АПВ УААН. Зразки крові відбирали за допомогою системи «Вакуете», де

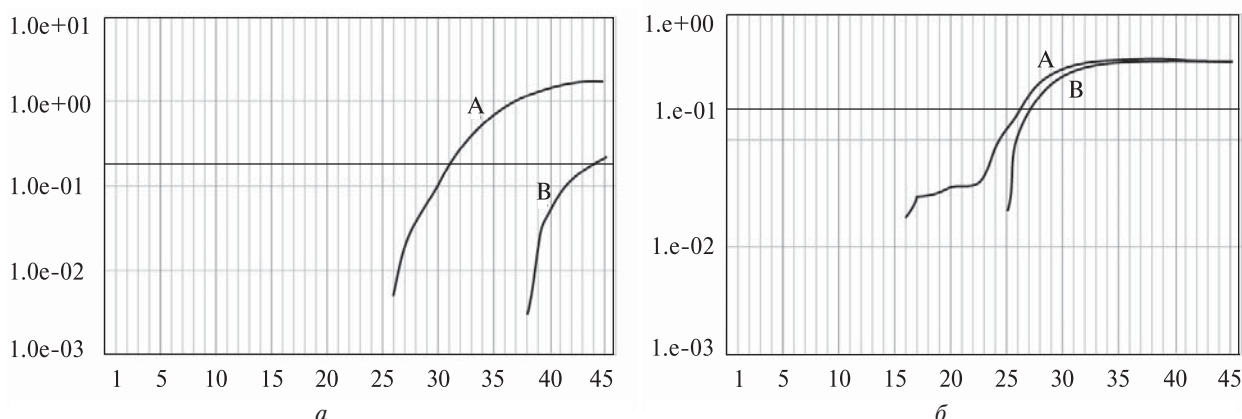


Рис. 2. Графіки ампліфікації генотипів AA (а) та АВ (б) гена каппа-казеїну у ВРХ: по вертикалі – ΔR_n ; по горизонталі – номер ампліфікаційного циклу реакції

як антикоагулянт використовують ЕДТА. ДНК виділяли з цільної крові за методом [11].

Для аналізу поліморфізму генів з використанням ПЛР у реальному часі використовували діагностичні системи, розроблені відділом молекулярної діагностики Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК. Ампліфікацію проводили в термоциклері Applied Biosystems 7000. Умови ампліфікації оптимізували для кожного локусу емпірично. Обрахунок та аналіз результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення, рекомендованого виробником (постачається в комплекті з даним приладом). Усі отримані дані перевіряли, додатково використовуючи ПЛР – ПДРФ діагностичні системи. Ампліфікацію проводили в термоциклері Applied Biosystems 2720. Рестрикційний аналіз здійснювали з використанням рестриктаз виробництва «Fermentas» (Литва) за методикою, рекомендованою виробником. Продукти рестрикції аналізували в 4%-ному агарозному гелі. Розмір продуктів рестрикції визначали за маркером молекулярної маси GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus («Fermentas», Литва). Розміри продуктів ампліфікації, рестриктази та розміри фрагментів рестрикції наведені в табл. 2. Дані, одержані двома методами, є статистично достовірними.

Результати досліджень та їх обговорення. В роботі представлені результати аналізу, проведеного з використанням двох незалежних ПЛР систем у реальному часі для SNP детекції генів *csn* та *dgat* у великої рогатої худоби.

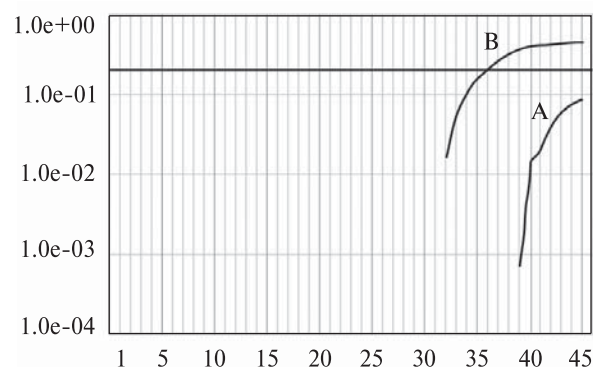


Рис. 3. Результати ампліфікації генотипу ВВ гена каппа-казеїну у ВРХ: по горизонталі – номер ампліфікаційного циклу реакції; по вертикалі – ΔR_n

Таблиця 2
Розміри продуктів ампліфікації, рестриктази та розміри продуктів рестрикції досліджених генів

Ген	Розмір амплікону, п.н.	Рестриктаза	Алель (розміри фрагментів рестрикції, п.н.)
<i>csn</i>	273	<i>Hinf I</i>	A (133, 91, 49) B (224, 49)
<i>dgat</i>	411	<i>Crf I</i>	A (203, 208) K (411)

Примітка. Праймери для ПЛР – ПДРФ аналізу: ctcgtagcttggcaggaaga DGAT-K; ctcgtagcttggcaggaaggc DGAT-A; tcaggtgtcgggtagctcac DGAT-R; ggctctcaataactctggagaat CSN-A; ggctctcaataactctggagaag CSN-B; ccattgctagtggtagcctaca CSN-R.

Обидві системи аналізу мають на меті визначення SNP мутацій у ВРХ, але досягнути повної 100%-ної дискримінації (розділення) алелів обох генів практично неможливо. Тео-