

Метод визначення сортової чистоти (типовості), гібридності, стерильності партій насіння на основі встановлення кількісного співвідношення алелів ДНК-маркерів

Ж. В. Вдовиченко, В. Г. Спиридонов, С. В. Хомутовська, М. Ф. Парій

Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041, e-mail: parii@myroslav@gmail.com

Мета. Розробити принципово новий метод визначення сортової чистоти (типовості), гібридності, стерильності партій насіння. **Методи** молекулярної біології (екстракція геномної ДНК, ПЛР із застосуванням SSR-маркерів, капілярний електрофорез), генетичний та статистично-математичний аналіз. **Результати.** Розроблено новий метод визначення сортових якостей партій насіння, що складається з таких етапів: одночасне виділення ДНК із репрезентативної сукупності насінин оцінюваного зразка; ПЛР та подальший аналіз продуктів ампліфікації шляхом визначення якісного та кількісного складу алелів маркерних SSR-послідовностей; розрахунок сортових показників якості партії насіння з використанням експериментально отриманих співвідношень алелів. **Висновки.** Розроблений метод визначення сортових якостей партій насіння дає змогу значно скоротити витрати матеріалів, часу та праці під час виконання аналізу. Послідовне якісне та кількісне визначення алелів у сукупному зразку партії насіння є принципово новим підходом для встановлення сортової чистоти (типовості), гібридності, стерильності.

Ключові слова: сортова чистота, типовість, гібридність, стерильність, ДНК-маркери, SSR-маркери, контроль якості партії насіння, ячмінь.

Вступ

Сучасні генетико-селекційні дослідження базуються на застосуванні ДНК-маркерів [1–3]. Також молекулярні маркери є зручними для контролю якості відтворення сортів та гібридів рослин. За допомогою ДНК-технологій можна локалізувати та маркувати як окремі гени та локуси кількісних ознак, так і окремі ділянки хромосом, цілі хромосоми і навіть геноми. Напрямами використання ДНК-маркерів є ідентифікація та диференціація особин, аналіз родинних зв'язків. Цей інструмент молекулярної біо-

логії широко використовують в криміналістиці, тваринництві та для сортової ідентифікації в рослинництві. Загалом ДНК-маркери – це будь які поліморфні ділянки ДНК, які виявляють молекулярними методами. Серед різних типів ДНК-маркерів два типи – SSR (simple sequence repeat) та SNP (single nucleotide polymorphism) – найбільше використовують завдяки їх широкій представленості у геномі та високому поліморфізму, який вони забезпечують [4, 5]. Розвиток сучасних технологій, у тому числі й секвенування, дає змогу розробити бази даних цих маркерів для більшості економічно важливих видів [6], а технологій матричного аналізу (Argays) – проводити генотипування одразу за багатьма маркерами [7].

Якщо в генетичному аналізі та під час ідентифікації й визначення родинних зв'язків фахівці в більшості випадків мають справу з окремими особинами, то в генетиці рослин та рослинництві об'єктом досліджень часто стають популяції з необмеженою кількістю осо-

Zhanna Vdovychenko
<http://orcid.org/0000-0002-6070-5518>
Vladislav Spirydonov
<http://orcid.org/0000-0003-1197-0507>
Stanislava Khomutovska
<http://orcid.org/0000-0003-4888-7184>
Myroslav Parii
<http://orcid.org/0000-0001-9877-2241>

бин – природні популяції або сорти рослин. Контролювати чистоту посівного матеріалу складніше у разі культивування перехресно-запильних культур. Але навіть під час розмноження самозапильних гомозиготних культур виникає така проблема, як засмічення посівного матеріалу іншими сортами.

Проведення аналізу за молекулярними маркерами на рівні популяції є проблемою технічного характеру. Найпоширенішим лабораторним методом визначення таких показників якості партій насіння, як сортова чистота (типовість) або рівень гібридності, є електрофоретичний розподіл запасних білків насіння, які характеризуються певним поліморфізмом, у поліакриламідному гелі. Цей спосіб передбачає екстракцію білків з кожної насінини та окремих їх розподіл. За співвідношенням типових та нетипових білкових профілей визначається оцінюваний показник [8, 9]. Такий спосіб, по-перше, має недостатню роздільну здатність через високий поліморфізм запасних білків, що часто призводить до неможливості диференціації сортів [10, 11]. По-друге, він є часо- та трудозатратним, оскільки потребує аналізу не менше ніж 50 насінин (зернівок), а за необхідності – до 1000 зернівок для партій добазового насіння. Для підвищення надійності аналізу було запропоновано ряд способів визначення сортової чистоти та типовості партій насіння, які базуються на використанні ДНК-маркерів, у тому числі й SSR [12]. Для визначення типовості гібридів соняшнику та кукурудзи за допомогою мікросателітів вже запроваджено міжнародні стандарти ISO/TR 17623:2015 та ISO/TR 17622:2015. Однак, за такого підходу кількість необхідних тестів може збільшуватись порівняно з аналізом за білковими маркерами, оскільки кожний окремих генотип слід протестувати за кількома поліморфними локусами. Оптимізації в такому аналізі досягають за допомогою мультиплексної ПЛП [13]. Проте ДНК-профіль кожної насінини зразка все рівно доводиться аналізувати окремо.

З огляду на наведене, для встановлення показників якості партій насіння актуальним є розроблення способу визначення якісного та кількісного складу алелів ДНК-маркерів в одному сукупному зразку. Якісний та кількісний склад алелів може бути встановлено одночасно або послідовно.

Найуживанішим типом кількісного аналізу вмісту ДНК у зразку є ПЛП у реальному часі [14], однак її застосування для найбільш поширених та досліджених типів маркерів є проблематичним, оскільки у випадку SSR та

SNP відмінність між двома алелями полягає лише в одному або кількох нуклеотидах. Для останнього типу маркерів розроблено систему кількісного аналізу, яка передбачає використання газо-рідинної хроматографії для розподілу алелів [15]. Одночасний аналіз якісного та кількісного складу мікросателітних локусів в одному зразку ДНК міг би отримати широке застосування у практиці [16].

Мета досліджень – розробити метод визначення сортових якостей партій насіння, зокрема сортової чистоти (типовості), гібридності, стерильності, який би забезпечив значне зниження собівартості аналізу, а також часо- та трудозатрати на аналіз.

Матеріали та методика досліджень

Як рослинний матеріал було використано сорти дворядного та шестирядного ячменю *Hordeum vulgare* L. з колекції Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК (УЛЯБП АПК) (табл. 1). Загалом було проаналізовано 27 сортів. Серед масиву сортів для продовження експерименту була обрана пара 'Danuta'/'Barke'. Для аналізу брали по одній типовій рослині від кожного сорту. Також у дослідження був залучений гібрид першого покоління між сортами 'Danuta' та 'Barke'. Для цього було використано одну з рослин, отриманих від схрещування зазначених сортів, після підтвердження її гібридного статусу за молекулярними маркерами.

Для дослідження було обрано мікросателітний локус *Vmac 0127*, локалізований у 6-й хромосомі. Ампліфікацію маркерної ділянки проводили з використанням олігонуклеотидних праймерів, один з яких ніс флуоресцентну мітку: [FAM]AАСТАТGTCCAGTCCGTTTCC та СТТGTСGТАТСАТСТТАТТCAGA (5'→3') [17].

Екстракцію ДНК здійснювали з паростків на 3–5-ту добу після проростання за ЦТАБ-методом [18], який дає змогу отримати досить значну кількість геномної нуклеїнової кислоти.

Концентрацію екстрагованої з рослинного матеріалу ДНК вимірювали приладом Eppendorf Bio Photometer 6131 згідно з інструкцією. Концентрацію вимірювали в одиницях нг/мкл. Отримані дані стосовно концентрації в подальшому дали можливість одержати суміші ДНК у необхідних розведеннях.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об'ємі 12,5 мкл. Реакційна суміш містила Taq-буфер 2,5 мМ MgCl₂, Taq-полімерази: 1,25 unit, кожний з нуклеозидтрифосфатів (dNTP mix) 0,1 мМ (всі реактиви компанії Амплісенс, РФ), кожен з праймерів 0,5 пМ/мкл, ДНК – 50 нг. Режим ампліфікації – 94 °C

протягом 3 хв, 58 °С – 1 хв, 72 °С – 1 хв; далі проводили 30 циклів з такими параметрами: денатурація протягом 30 с при 94 °С, відпал – 30 с при 58 °С, синтез – 30 с при 72 °С; закінчення – при 72 °С протягом 5 хв.

Продукти ампліфікації розподіляли методом капілярного електрофорезу за допомогою генетичного аналізатора Applied Biosystems (ABI) Hitachi 3130xl Prism Genetic Analyzer.

У результаті розгонки продуктів ПЛР було отримано експериментальні значення висоти піків флуоресценції, які свідчать про інтенсивність флуоресцентного сигналу. Висоту піків вимірювали генетичним аналізатором в умовних одиницях UF (unit of fluorescence). Отримані значення застосовано для розрахунку співвідношення кількості ДНК для двох алелів – R (ratio), яке в свою чергу було використане для розрахунку частоти кожного з алелів p та q , а також показника сортової чистоти згідно з [16].

Результати досліджень

Результати генотипування колекції сортів ячменю за локусом *Vtns 0127* наведено в таблиці 1. Оскільки ячмінь є самозапильною культурою, то, відповідно, кожен зразок сорту являє собою гомозиготну лінію. У процесі полімеразної ланцюгової реакції з ДНК сортів продукувався лише один алель, за винятком сорту 'Бадьорій', в якого було виявлено два алелі, що може свідчити про наявну дуплікацію в геномі цього сорту. Генотипування колекції сортів за локусом *Vtns 0127* виявило 7 алелів – 112, 118, 120, 122, 124, 126 та 128 п.н. Найчастіше траплявся алель 122 п.н., властивий 7 сортам з колекції. Алель 112 п.н. виявлено лише у сорту 'Barke'. Для подальших досліджень обрали два алелі з найбільшою і найменшою частотою – 112 та 122 п.н. (частоти 0,037 та 0,259 відповідно).

Таблиця 1

Результати генотипування колекції сортів ячменю за локусом *Vtns 0127*

Розмір алеля, п.н.	Назва сорту	Частота алеля
112	'Barke'	0,037
118	'Freja', 'Бадьорій'	0,074
120	'Оболонь', 'Чарівний', 'Klages', 'Schuylar', 'Annabell'	0,185
122	'Danuta', 'Чудовий', 'Pejas', 'Ingrid', 'Kamial', 'Boyer', 'Hesk'	0,259
124	'Celinka', 'Pasadena', 'Tolar', 'Husky', 'Scarlett', 'O.A.C.21'	0,222
126	'Звершення', 'Цезар', 'Betzes'	0,111
128	'Jersey', 'Вакула', 'Джерело', 'Бадьорій'	0,148

Для моделювання різного співвідношення двох алелів у лабораторному зразку було приготовлено набір розчинів з певною концентрацією ДНК двох сортів ячменю 'Danuta' та 'Barke'. Процентні концентрації, які було використано, наведено в таблиці 2. Ці розведення моделювали суміш ДНК під час виділення нуклеїнової кислоти із сукупності зернівок сорту ячменю, що містить домішки іншого сорту.

Застосований метод визначення співвідношень алелів під час ПЛР аналізу ДНК зразка базується на тому, що кількість продуктів ампліфікації в одних і тих же умовах залежить від вихідної кількості матричної ДНК у зразку і, відповідно, кількість ампліфікованих фрагментів кожного алеля буде залежати від вихідної кількості матричної ДНК відповідного типу.

Після проведення ПЛР з набором сумішей № 1–12 ДНК сортів та подальшого фрагментного аналізу продуктів ПЛР методом капілярного електрофорезу було отримано пари піків з різною інтенсивністю флуоресценції, які відповідають парі досліджуваних алелів 112 та 122 п.н. Електрофореграми батьківських сортів, а також кількох сумішей ДНК наведено на рисунках 1 і 2.

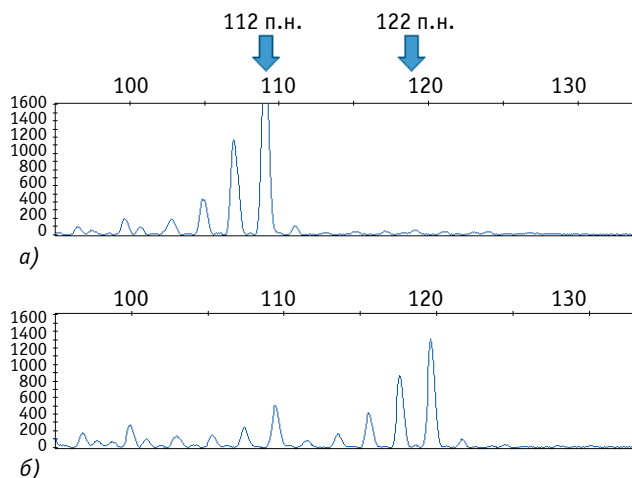


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу *Vtns 0127* з матричною ДНК сортів: а) 'Barke', б) 'Danuta'

Крім модельних розведень, як контрольний використовували гібрид F_1 від схрещування відповідних сортів 'Barke' та 'Danuta' (розчин № 12). Співвідношення алелів у гібриді першого покоління становить 1 : 1, тому співвідношення піків гібрида F_1 мало відповідати співвідношенню піків суміші № 6 (50 % : 50 %).

Висота піка (UF) свідчить про інтенсивність флуоресцентного сигналу, що в свою чергу свідчить про кількість специфічної ДНК у початковому зразку. Дані про висоту піків та їх співвідношення, які отримали в

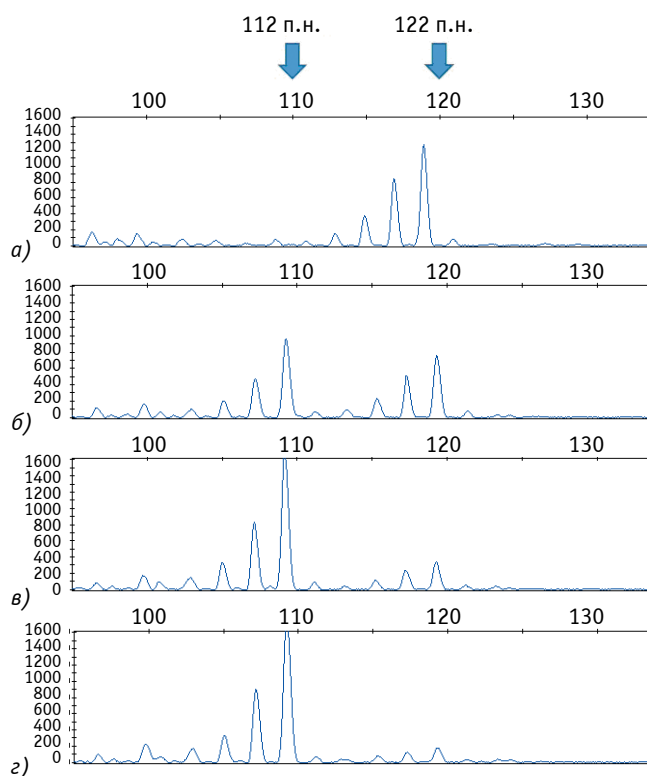


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу *Vtas 0127* з матричною ДНК сортів 'Danuta' та 'Barke' у співвідношеннях: а) 20% : 80%, б) 50% : 50%, в) 80% : 20%, г) 90% : 10%.

ході експерименту, наведено в таблиці 2. Як видно з рисунка 2 і таблиці 2, висота піків флуоресценції у гібрида та в суміші 50 % : 50 % не була однаковою для обох алелів, які досліджували. Це можна пояснити специфічністю ПЛР для різних алелів. Тому для подальших розрахунків був введений коефіцієнт пропорційності, що розраховувався як

відношення показників флуоресценції для обох алелів (122 п.н. та 112 п.н.) (розчин № 12): $562 \text{ UF}/714 \text{ UF} = 0,787$.

Таким чином, коефіцієнт пропорційності становив 0,79. Використовуючи значення інтенсивності піків флуоресценції в суміші № 6 (50 % : 50 %), отримали дуже близьке значення коефіцієнта пропорційності, як і очікувалося: $754 \text{ UF}/962 \text{ UF} = 0,783$.

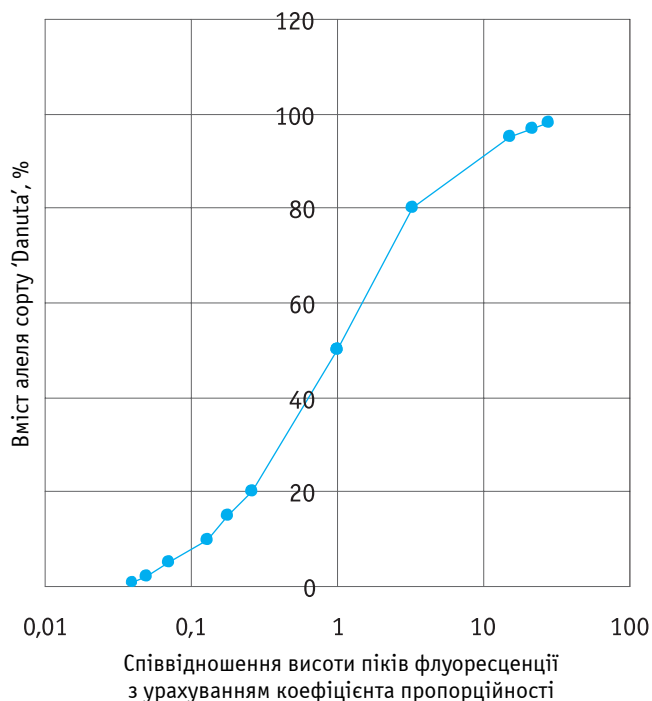


Рис. 3. Залежність співвідношення висоти піків флуоресценції з урахуванням пропорційності (горизонтальна логарифмічна вісь) від кількісного співвідношення алелів у матричній ДНК (вертикальна вісь)

Таблиця 2

Перелік приготовлених сумішей ДНК двох сортів 'Danuta' та 'Barke' зі значеннями висоти піків флуоресценції за маркером *Vtas 0127*

Суміш	Вміст ДНК сорту 'Danuta', (%)	Вміст ДНК сорту 'Barke', (%)	Висота піку флуоресценції алеля 122 п.н., UF	Висота піку флуоресценції алеля 112 п.н., UF	Співвідношення висоти піків флуоресценції (алель 122 п.н./алель 112 п.н.)	Співвідношення висоти піків флуоресценції з урахуванням коефіцієнта пропорційності
1	99	1	843	— *	—	—
2	98	2	1190	54	22,04	28,00
3	95	5	1356	114	11,89	15,11
4	90	10	179	—	—	—
5	80	20	1310	514	2,55	3,24
6	50	50	754	962	0,78	1,00
7	20	80	340	1693	0,20	0,26
8	10	90	179	1812	0,10	0,13
9	5	95	68	1440	0,05	0,06
10	2	98	78	2126	0,04	0,05
11	1	99	83	2771	0,03	0,04
12	Гібрид F ₁		562	714	0,79	1,00
13	97	3	1273	74	17,20	21,86
14	15	85	284	2058	0,14	0,18

* Пік не детектувався.

На рисунку 3 показано залежність кількісного вмісту алелів у матричній ДНК (вертикальна вісь) від співвідношення висоти піків флуоресценції з урахуванням коефіцієнта пропорційності (горизонтальна вісь). Горизонтальна вісь являє собою логарифмічну шкалу. Цей прийом графічного відображення результатів обрано через його зручність під час роботи з даними, що мають широкий діапазон варіювання.

Плавність графіка додатково свідчить про адекватні умови постановки експерименту та ефективність ампліфікації алелів незалежно від кількісного вмісту з роздільною здатністю 1%. Тому використання способу визначення вмісту домішок сторонньої ДНК у пробі, виділеної із сукупності зернівок, за співвідношенням піків типових та нетипових алелів слід вважати ефективним.

У роботі [16] показано, як отримане в експерименті співвідношення кількості ДНК для двох алелів – R (ratio) можна використати для розрахунку частоти кожного з алелів p та q , а також показників сортової чистоти та гібридності. Для цього потрібно застосовувати формули:

$$R = p/q \quad (1)$$

$$q = 1 - p \quad (2)$$

$$\text{звідси } p = \frac{R}{1 + R} \quad (3)$$

$$\text{Сортова чистота} = p \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{Гібридність} = (3 - 3p) \times 100\% \quad (5)$$

Застосований метод визначення співвідношення кількості відповідних фрагментів ДНК у початковому зразку можна вважати успішним, якщо воно буде у повній відповідності зі співвідношенням висоти піків флуоресценції для двох алелів.

Для перевірки точності аналізу додатково приготували дві тестові суміші – № 13 і № 14 із вмістом ДНК алелів 122 п.н. та 112 п.н. у кількості 97% : 3% та 15% : 85% відповідно. Згідно з таблицею 2 співвідношення висоти піків флуоресценції з урахуванням коефіцієнта пропорційності для двох сумішей дорівнює 21,86 та 0,18. Підставляючи ці

значення у формули (3) та (4), отримуємо значення сортової чистоти 96% та 15% відповідно, що є дуже близьким до значень концентрацій у приготовлених сумішах.

За результатами аналізу сумішей № 2, 10, 11 із вмістом домішки 1–2% відповідні піки детектувалися з очікуваними значеннями інтенсивності флуоресценції (табл. 2). Це означає, що цей метод є досить чутливим, дає змогу в одній сукупній пробі аналізувати до 100 насінин та отримувати значення сортової чистоти з точністю 1–2%.

Показана принципова можливість здійснення кількісного аналізу за SSR-маркерами має реалізуватися таким чином: створення системи ДНК маркерів з високою ідентифікаційною здатністю, емпіричне визначення ефективності попарної ампліфікації локусів, проведення аналізу з урахуванням ефективності попарної ампліфікації. Для більшості сільськогосподарських культур розроблено системи мікросателітних маркерів та проведено вивчення поліморфізму сортів за цими системами. З використанням кількісного аналізу ці системи можуть бути адаптовані для визначення основних показників сортових якостей партій насіння – типовість ліній та сортова чистота, гібридність партій насіння, а також рівень стерильності за наявності мікросателітних локусів, зчеплених із геном закріплення-відновлення. Позитивним моментом за такого типу аналізу є можливість проведення мультиплексної ПЛР.

Кількісний аналіз за SSR-маркерами можна проводити шляхом послідовного визначення: спочатку якісного складу алелів маркерів в одній реакції, а потім співвідношення тільки тих алелів, які виявили поліморфізм під час першої реакції. Внаслідок застосування такої послідовності аналізу кількість реакцій може бути зменшеною до двох. Наприклад, у разі використання SNP або SSR-маркерів проводиться перша мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція, в якій визначається якісний склад алелів. На другому етапі обирається один з маркерів, що виявився поліморфним, проводиться ПЛР та визначається кіль-

Таблиця 3

Порівняння кількості необхідних аналізів у разі застосування традиційних методів визначення сортових якостей партій насіння та запропонованого методу

Спосіб визначення	Необхідна кількість аналізів для виявлення 1% домішок
Електрофорез запасних білків	100
Електрофорез продуктів ампліфікації ДНК-маркерів	100 × кількість маркерів
Метод визначення кількісного співвідношення алелів мікросателітних маркерів у зразку ДНК	Етапи здійснення: 1) 1 мультиплексна реакція для визначення якісного складу алелів у зразку, 2) 1 або 2 реакції за поліморфними маркерами, виявленими у першій реакції. За необхідності реакцію можна виконати у 2–3-х повторях

кісне співвідношення алелів. Для збільшення точності можливим є варіант кількісного аналізу двох поліморфних маркерів. У таблиці 3 наведено порівняння кількості необхідних аналізів під час застосування традиційних методів та запропонованого методу.

Висновки

Реалізація методу визначення сортових якостей партій насіння на основі встановлення кількісного співвідношення алелів ДНК-маркерів дає змогу істотно скоротити кількість ПЛР, що значно пришвидшує та з дешевлює аналіз сортових показників якості партій насіння. Іншими перевагами запропонованого методу є те, що кількість локусів, за якими буде проводитись аналіз, можна значно збільшити; за необхідності, тест-система включала локуси, рівномірно розподілені по геному рослин; обсяг вибірки також може бути значно збільшений порівняно з традиційними методами і обмежується тільки розподільною здатністю методу визначення кількісного вмісту алелів у суміші ДНК. Все це значно підвищує достовірність аналізу.

На цьому етапі розроблення методу продемонстровано принципову можливість розрахувати вміст певної ДНК у модельній суміші зі 100 насінин з точністю до 1–2%. Такий метод визначення кількісного вмісту ДНК у зразку за допомогою SSR-маркерів доцільно використовувати у сумішах, де представлено ДНК-фрагменти двох фіксованих SSR-алелів, наприклад для визначення гібридності. Для визначення сортової чистоти або типовості партій насіння, де спектр алелів може бути ширшим, метод потребує додаткового доопрацювання.

Використана література

1. Леонова И. Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов / И. Н. Леонова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Том 17, № 2. – С. 314–325.
2. Sivolap Yu. M. Molecular markers and plant breeding / Yu. M. Sivolap // Cytol Genet. – 2013. – Vol. 47, Iss. 3. – P. 188–195. doi: 10.3103/S0095452713030080
3. Plant Molecular Breeding / H. J. Newbury (ed.). – Birmingham, UK : Blackwell Publ., CRC Press, 2003. – 265 p.
4. Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics / A. Rafalski // Curr Opin Plant Biol. – 2002. – Vol. 5, Iss. 2. – P. 94–100. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00240-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00240-6)
5. Becker J. Barley microsatellites: allele variation and mapping / J. Becker, M. Heun // Plant Mol. Biol. – 1995. – Vol. 27, Iss. 4. – P. 835–845. doi: 10.1007/BF00020238
6. Edwards D. Plant genome sequencing: applications for crop improvement / D. Edwards, J. Batley // Plant Biotechnol J. – 2010. – Vol. 8, Iss. 1. – P. 2–9. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00459.x
7. Gut I. G. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms / I. G. Gut // Hum Mutat. – 2001. – Vol. 17, Iss. 6. – P. 475–492. doi: 10.1002/humu.1131
8. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции / А. А. Созинов. – М. : Наука, 1985. – 272 с.
9. Анисимова И. Н. Идентификация сортов, линий и гибридов по составу полипептидов гелиантина / И. Н. Анисимова // Сб. науч. трудов по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1987. – Т. 114. – С. 114–126
10. Сиволап Ю. М. ДНК-технології в реєстрації й охороні прав на сорти рослин / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. – 2005. – № 1. – С. 66–74. doi: 10.21498/2518-1017.1.2005.66849
11. Рибалка О. І. Генетична гетерогенність сортів пшениці одеської селекції за алельним складом GLI/GLU локусів / О. І. Рибалка, М. В. Червоніс, М. А. Литвиненко // Вісник аграрної науки. – 2008. – № 2. – С. 54–59.
12. Диференціація, ідентифікація, визначення типовості та гібридності сільськогосподарських культур за ДНК-профілюванням : методичні рекомендації / М. С. Бальвінська, Н. Е. Волкова, О. О. Колесник [та ін.]. – Одеса : Астропринт, 2015. – 40 с.
13. Генетическая чистота семян – актуальный вопрос современной генетики и селекции растений / Г. Е. Акинина, Ю. Н. Тереняк, Я. Ю. Шарыпина, В. Н. Попов // Фактори экспериментальной эволюции организмов : сб. науч. пр. – К. : УТГіС, 2016. – Т. 18. – С. 56–60.
14. McPherson M. J. PCR / M. J. McPherson, S. G. Moller. – 2nd ed. – New York : Taylor & Francis Group, 2006. – P. 209–232.
15. Cheap, accurate and rapid allele frequency estimation of single nucleotide polymorphisms by primer extension and DHPLC in DNA pools / B. Hoogendoorn, N. Norton, G. Kirov [et al.] // Hum Genet. – 2000. – Vol. 107, Iss. 5. – P. 488–493.
16. Парій М.Ф. Спосіб визначення сортової чистоти та типовості партій насіння сільськогосподарських культур з використанням ДНК-маркерів / Парій М. Ф., Вдовиченко Ж. В., Спиридонов В. Г. // Патент України на винахід 56555, МПК7 А 01Н 1/04. – № у 2007 11049 ; Заявлено 08.10.2007 ; Опубліковано 25.01.2011, Бюл. № 7. 2011.
17. A simple sequence repeat-based linkage map of barley / L. Ramsay, M. Macaulaya, S. degli Ivanisovich [et al.] // Genetics. – 2000. – Vol. 156, No. 4. – P. 1997–2005.
18. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants / M. Keb-Llanes, G. Gonzalez, B. Chi-Manzanero, D. Infante // Plant Mol. Biol. Rep. – 2002. – Vol. 20, No. 3. – P. 299a–299e.

References

1. Leonova, I. N. (2013). Molecular markers: implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. *Vavilovskij Zhurnal Genetiki i Selekcii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding], 17(2), 314–325. [in Russian]
2. Sivolap, Yu. M. (2013). Molecular markers and plant breeding. *Cytol Genet.*, 47(3), 188–195. doi: 10.3103/S0095452713030080
3. Newbury, H. J. (Ed.). (2003). *Plant Molecular Breeding*. Birmingham, UK: Blackwell Publ., CRC Press.
4. Rafalski, A. (2002). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol.*, 5(2), 94–100. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00240-6
5. Becker, J., & Heun, M. (1995). Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.*, 27(4), 835–845. doi: 10.1007/BF00020238
6. Edwards, D., & Batley, J. (2010). Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnol J.*, 8(1), 2–9. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00459.x
7. Gut, I. G. (2001). Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat.*, 17(6), 475–492. doi: 10.1002/humu.1131
8. Sozinov, A. A. (1985). *Polimorfizm belkov i ego znachenie v genetike i selekcii* [Polymorphism of proteins and its importance in genetics and breeding]. Moscow: Nauka. [in Russian]
9. Anisimova, I. N. (1987). Identification of varieties, lines and hybrids for the composition of helianthine polypeptides. *Sbornik nauchnykh trudov po prikladnoy botanike, genetike i selekcii* [Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding], 114, 114–126. [in Russian]

10. Syvolap, Yu. M., & Kozhukhova, N. E. (2005). DNA techniques in the registration and protection of plant varieties rights. *Sortovivčennâ ohor. prav sorti roslin* [Plant Varieties Studying and Protection], 1, 66–74. doi: 10.21498/2518-1017.1.2005.66849. [in Ukrainian]
11. Rybalka, O. I., Chervonis, M. V., & Lytvynenko, M. A. (2008). Genetic heterogeneity of wheat varieties developed in Odesa for allelic composition of GLI/GLU loci. *Visnyk aharnoi nauky* [Bulletin of Agricultural Science], 2, 54–59. [in Ukrainian]
12. Balvinska, M. S., Volkova, N. E., Kolesnyk, O. O., Solodenko, A. Ye., & Chebotar, S. V. (2015). *Dyferentsiatsiia, identyfikatsiia, vyznachennia tyrovosti ta hibrydnosti silskohospodarskykh kultur za DNK-profiluvanniam* [Differentiation, identification, determination of typicality and hybridity of cultivated crops for DNA profiling]. Odesa: Astroprint. [in Ukrainian]
13. Akinina, G. E., Terenyak, Yu. N., Sharypina, Ya. Yu., & Popov V. N. (2016). Genetic purity of seeds – actual question of modern genetics and plant breeding. *Fakt. eksp. evol. org.* [Factors in experimental evolution of organisms], 18, 56–60. [in Russian]
14. McPherson, M. J., & Moller, S. G. (2006). *PCR* (pp. 209–232). (2nd ed.). New York: Taylor & Francis Group.
15. Hoogendoorn, B., Norton, N., Kirov, G., Williams, N., Hamshere, M. L., Spurlock, G., ... O'Donovan, M. C. (2000). Cheap, accurate and rapid allele frequency estimation of single nucleotide polymorphisms by primer extension and DHPLC in DNA pools. *Hum Genet.*, 107(5), 488–493.
16. Parii, M. F., Vdovychenko, Zh. V., & Spirydonov, V. H. (2011). *Method for determining varietal purity and typicalness of lots of seed of farm crops using dna-markers*. Ukraine patent for invention, МПК7 А 01Н 1/04. – No. u 2007 11049. [in Ukrainian].
17. Ramsay, L., Macaulaya, M., degli Ivanisovich, S., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., ... Waugh, R. (2000). A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics*, 156(4), 1997–2005.
18. Keb-Llanes, M., Gonzales, G., Chi-Manzanero, B., & Infante, D. (2002). A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 20(3), 299a–299e.

УДК 577.21+631.522/.524

Вдовиченко Ж. В., Спиридонов В. Г., Хомутовская С. В., Парий М. Ф.* Метод определения сортовой чистоты (типичности), гибридности, стерильности партий семян на основе установления количественного соотношения аллелей ДНК-маркеров // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. – 2016. – № 4. – С. 56–62. [http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.4\(33\).2016.88678](http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.4(33).2016.88678)

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, ул. Героев Оборонь, 15, г. Киев, Украина, 03041, e-mail: pariimyroslov@gmail.com

Цель. Разработать принципиально новый метод определения сортовой чистоты (типичности), гибридности, стерильности партий семян. **Методы** молекулярной биологии (экстракция геномной ДНК, ПЦР с применением SSR-маркеров, капиллярный электрофорез), генетический и статистически-математический анализ. **Результаты.** Разработан новый метод определения сортовых качеств партий семян, состоящий из следующих этапов: одновременное выделение ДНК из репрезентативной совокупности семян оцениваемого образца; ПЦР и дальнейший анализ продуктов амплификации путем определения качественного и количественного состава аллелей маркерных SSR-последовательностей; расчет сортовых показателей

качества партии семян с использованием экспериментально полученных соотношений аллелей. **Выводы.** Разработанный метод определения сортовых качеств партий семян позволяет значительно сократить расход материалов, времени и труда при выполнении анализа. Последовательное качественное и количественное определение аллелей в совокупном образце партии семян является принципиально новым подходом для установления сортовой чистоты (типичности), гибридности, стерильности.

Ключевые слова: сортовая чистота, типичность, гибридность, стерильность, ДНК-маркеры, SSR-маркеры, контроль качества партии семян, ячмень.

UDC 577.21 + 631.522 / .524

Vdovychenko, Zh. V., Spirydonov, V. H., Khomutovska, S. V., & Parii, M. F.* (2016). Method for determination of varietal purity (typicality), hybridity, sterility of seed lots based on the establishment of the quantitative ratio of alleles of DNA markers. *Sortovivčennâ ohor. prav sorti roslin* [Plant Varieties Studying and Protection], 4, 56–62. [http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.4\(33\).2016.88678](http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.4(33).2016.88678)

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15 Heroiv Oborony Str., Kyiv, Ukraine, 03041, e-mail: pariimyroslov@gmail.com

Purpose. To develop a conceptually new method for determination of varietal purity (typicality), hybridity, sterility of seed lots. **Methods** of molecular biology (genomic DNA extraction, PCR with SSR markers application, capillary electrophoresis), genetic, statistical, mathematical analysis. **Results.** New method for determining the varietal qualities of seed lot was developed that consists of the following steps: simultaneous DNA extraction from a representative sample of aggregated seeds; PCR and further analysis of the amplification products by determination of the qualitative and quantitative composition of SSR-markers' alleles; cal-

culatation of values of varietal seed lot quality using experimentally derived allele ratios. **Conclusions.** The developed method for determining varietal qualities of seed lots allows to reduce significantly the consumption of materials, time and labor during the analysis. Consistent qualification and quantification of alleles in the total sample of a seed lot is a conceptually new approach to establish varietal purity (typicality), hybridity, sterility.

Keywords: varietal purity, typicality, hybridity, sterility, DNA markers, SSR markers, quality control of seed lots, barley. *Надійшла 18.10.2016*