

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ОВОЧІВНИЦТВА І БАШТАННИЦТВА НААН

**КАБАЧОК (*Cucurbita pepo* L.).  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МЕТОД  
ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СЕЛЕКЦІЙНО ЦІННИХ ГЕНОТИПІВ  
ЗА ДОПОМОГОЮ АНАЛІЗУ  
МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ**

**Методичні рекомендації**

Селекційне, 2018

Кондратенко С.І., Ланкастер Ю.М., Сергієнко О.В., Самовол О.П. *Кабачок (Cucurbitarperо L.). Молекулярно-генетичний метод диференціації селекційно цінних генотипів за допомогою аналізу міжмікросателітних локусів.* ІОБ НААН, 2018. – 24 с.

Рекомендовано до друку вченою радою Інституту овочівництва і баштанництва НААН (протокол № 14 від 15.11.2018 р.)

У методичних рекомендаціях викладено принципимолекулярно-генетичної диференціації кабачка (*Cucurbitarperо L.*) на основі використання техніки ISSR-ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції), наведено вимоги, яким повинна відповідати ПЛР-лабораторія, а також перелік необхідного обладнання. Наведено характеристику основних етапів ДНК-виділення кабачка, починаючи з відбору проб і закінчуючи опрацюванням отриманих результатів.

Методичні рекомендації можуть бути використані фахівцями-біотехнологами при проведенні дослідницьких робіт з овочевими рослинами, селекціонерам, насінневодам, а також студентам, викладачам, аспірантам, які цікавляться питаннями молекулярно-генетичної ідентифікації сільськогосподарських видів рослин.

*Рецензенти:*

кандидат с.-г. наук, Р.В. Крутько;

кандидат с.-г. наук, Н.О. Баштан

© Інститут овочівництва і баштанництва. НААН, 2018

## ЗМІСТ

		Стор.
	ПЕРЕДМОВА	4
1.	ТЕРМІНИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОНЯТЬ	5
2.	ПОЗНАЧКИ ТА СКОРОЧЕННЯ	6
3.	ОБЛАДНАННЯ ТА ВИТРАТНІ МАТЕРІАЛИ	6
4.	ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ	7
5.	ЕТАПИ ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯ	10
5.1	<i>ВІДБІР ПРОБ ЗРАЗКІВ КАБАЧКА</i>	10
5.2	<i>ВИДІЛЕННЯ ДНК</i>	10
5.2.1	<i>Підготовка до виділення ДНК</i>	10
5.2.2	<i>Процедура виділення та очищення ДНК</i>	10
5.3	<i>ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДНК</i>	11
5.4	<i>ЗБЕРІГАННЯ ПРОБ</i>	11
5.5	<i>ВИМОГИ ЩОДО БЕЗПЕКИ</i>	11
6.	ВИМОГИ ДО ПРИМІЩЕНЬ, ПОСУДУ ТА МАТЕРІАЛІВ	12
7.	ПРОВЕЖЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР)	12
7.1	<i>ЕЛЕКТРОФОРЕЗ, ВІЗУАЛІЗАЦІЯ ТА СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ ДНК</i>	13
7.2	<i>ДОКУМЕНТУВАННЯ ТА КОНТРОЛЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ</i>	13
8.	ОФОРМЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	14
9.	ПРИКЛАД ПРОВЕДЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ЗРАЗКІВ КАБАЧКА	14
9.1	<i>АНАЛІЗ ІНФОРМАТИВНИХ МОЖЛИВОСТЕЙ ВІДІБРАНИХ ISSR-ПРАЙМЕРІВ</i>	14
9.2	<i>АНАЛІЗ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ЗВ'ЯЗКІВ МІЖ ПРОАНАЛІЗОВАНИМИ ГЕНОТИПАМИ КАБАЧКА ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОГО РОЗДІЛЕННЯ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ ISSR-ПРАЙМЕРІВ</i>	17
	ДОДАТКИ	21
	БІБЛІОГРАФІЯ	23

## ПЕРЕДМОВА

Синтетична селекція з елементами молекулярного маркування господарсько-цінних ознак отримала теоретичне обґрунтування у чисельних публікаціях та впроваджена у більшості селекційних фірм і установ різних країн світу. Але у вітчизняних програмах наукових досліджень даний метод порівняно з традиційними, ще не набув широкого розповсюдження. Ефективність використання ДНК-маркерів у селекції будь-якої культури залежить не тільки від встановлення асоціації між маркером та геном, але й від проведення валідації (тестування) кожного ДНК-маркера на різноманітному вітчизняному або іноземному селекційному матеріалі з урахуванням різного генетичного оточення. Серед різноманіття довільних праймерів, які на теперішній час використовуються у селекції економічно важливих видів рослин найбільшого поширення набули ті, які детектують алельний склад міжмікросателітних локусів.

До основних переваг ISSR-маркерів відносяться домінантний тип спадкування (відсутність-присутність) та відносно висока точність і поліпшена відтворюваність у порівнянні з RAPD-методом у зв'язку з більшою довжиною праймера (19–23 п. н.) та більш високою температурою відпалу, за якої ISSR-праймер зможе прикріпитися до комплементарної ділянки ДНК. Передбачається, що мінливість спектра фрагментів ампліфікації при використанні ISSR-маркерів нейтральна до факторів відбору та до подій еволюційного рангу і оптимально відповідає рішенням завдань об'єктивної оцінки генетичних взаємозв'язків між генофондами досліджуваного виду рослини. ISSR-ПЛР є підхід, який можна застосовувати для таксономічного та філогенетичного порівняння і як засіб картування широкого спектра рослинних організмів.

Раніше була продемонстрована можливість використання ПЛР-техніки для зменшення кількості неефективних схрещувань у синтетичній селекції важливих сільськогосподарських культур (Lanza et al. (1997) [1], Кожухова (2008) [2]). Це стало можливим завдяки розрахункам кореляційних зв'язків між генетичними дистанціями, розрахованими за даними ПЛР-аналізу та важливими агрономічними ознаками вихідних форм та похідних від них простих гібридів (Вербицкая та ін. (1997) [3], Кожухова та ін. (2003) [4]).

Кабачок (*Cucurbita pepo* L.) є овочевою культурою роду *Cucurbitaceae*, яку широко використовують в усьому світі для дієтичного і дитячого харчування, як сировину для консервної промисловості, у кормових і лікувально-профілактичних цілях. Збільшення сортименту культури сьогодні залежить від успіхів генетико-селекційних досліджень. Зокрема впровадження досягнень з молекулярної генетики дозволять проводити ідентифікацію і паспортизацію генотипів, вести маркер-асоційовану селекцію, що сприятиме прискоренню селекційного процесу, підвищенню його ефективності, збереженню та розширенню генофонду культури.

У сучасних умовах молекулярно-генетичний аналіз з використанням різних типів ДНК-маркерів є потужним методом вивчення генетичного різноманіття, філогенезу та реалізації різних селекційних і генетичних програм сільськогосподарських культур (Леонова И.Н. (2013) [5], Хлесткина Е.К. (2013) [6]). Однак кабачок залишається недостатньо вивченим у цьому напрямі. Зокрема,

Xanthoroulou1 A. зі співавторами (Xanthoroulou1 A. et. al. (2015) [7]) під час аналізу генетичного різноманіття кабачків грецької зародкової плазми відмітили ефективність ScoT і ISSR маркерів у подібних дослідженнях. При цьому останні виявилися більш поліморфними. Gong L. та інші (Gong L. et. al. (2011) [8]) на основі результатів вивчення генетичних відносин між 104 популяціями *Cucurbitapepo* L. з використанням SSR і ISCAR-маркерів запропонували можливий шлях еволюції культурних підвидів кабачків від спільного попередника. Ефективність RAPD, ISSR, SSR, AFLP та інших типів молекулярних маркерів у різних популяційних і генетико-селекційних програмах висвітлена в роботах Abdel-Nameed K.E.et. al. (2015) [9], Brown R.N. (2001) [10], Ferriol et. al. (2003) [11], M. Esmailnia E.et. al. (2015) [12], Hadia H.A.et. al. (2008) [13], Katzir N. Et. al. (2000) [14], NtuliN.R. et. al. (2015) [15], Radwan S.A. (2014) [16].

Проте розширення знань з молекулярної генетики кабачка залишається актуальним. Важливими є дослідження генетичного поліморфізму генотипів вихідного і селекційного матеріалу кабачків з метою полегшення їх ідентифікації і диференціації, а також з'ясування рівня генетичної дивергенції між вихідними батьківськими формами для більш ефективного планування селекційних заходів, зокрема гібридизації.

У проведеній нами роботі було проведено дослідження генетичної мінливості сортів і гібридів F<sub>1</sub> *Cucurbitapepo* L. різного географічного походження за міжмікросателітними маркерами (ISSR, Inter Simple Sequence Repeats) з метою з'ясування філогенетичних відносин між залученими у роботу генотипами для їх подальшого залучення до селекційного процесу і створення на їх основі нових високопродуктивних і адаптивних сортів і гібридів кабачка.

## 1. ТЕРМІНИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОНЯТЬ

*АЛЛЕЛЬ* – одна з кількох альтернативних форм гена, кожна з яких характеризується унікальною послідовністю нуклеотидів.

*АМПЛІФІКАТОР ДНК* (термоциклер) – прилад, необхідний для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); дозволяє задавати потрібну кількість циклів і вибирати оптимальні часові і температурні параметри для кожної процедури циклу.

*АМПЛІФІКАЦІЯ ДНК* – вибіркове копіювання визначеної ділянки ДНК.

*ГЕНОМ* – загальна генетична інформація, що міститься в генах організму.

*ДНК-ПОЛІМЕРАЗА* – фермент, який виконує функцію матричного синтезу ДНК.

*ЛОКУС* – ділянка ДНК (хромосоми), де розташована означена генетична детермінанта.

*ПРАЙМЕР* – нуклеотидна послідовність довжиною від 10 до 30 нуклеотидів, яка комплементарно пов'язана з одонитчатою ДНК або РНК.

*ДЕНАТУРАЦІЯ* – порушення просторової структури молекули в результаті розриву внутрішньо- або в міжмолекулярних нековалентних зв'язків.

*КОМПЛЕМЕНТАРНІСТЬ* – явище взаємного доповнення відповідних одна-одній хімічних структур.

*МАРКЕР* – морфологічний, біологічний або молекулярний легко визначаємий показник, зчеплений з ознакою.

*МАТРИЦЯ* – ДНК з двома ланцюгами на якій відбуваються процеси реплікації та транскрипції.

*НУКЛЕАЗИ* – ферменти, які руйнують фосфодієфірні зв'язки в молекулах ДНК та РНК

*ОЛІГОНУКЛЕОТИД* – ланцюг, що складається з декількох (від 2 до 20) нуклеотидних залишків.

*ПОЛІМЕРАЗИ* – ферменти, що здійснюють матричний синтез нуклеїнових кислот.

*РЕПЛІКАЦІЯ* – процес копіювання молекул нуклеїнових кислот.

*ЕПЕНДОРФ* – пластикова мікропробірка.

*ISSR (Inter – Simple Sequence Repeat)* – послідовність між простими повторами.

## 2. ПОЗНАЧКИ ТА СКОРОЧЕННЯ

*ДНК* – дезоксирибонуклеїнова кислота;

*ПЛР* – полімеразна ланцюгова реакція;

*п. н.* – пар нуклеотидів;

*ТЕ* – буферний розчин, який використовують для розчинення ДНК;

*dNTP* – суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів.

## 3. ОБЛАДНАННЯ ТА ВИТРАТНІ МАТЕРІАЛИ

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

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

– баня водяна;

– бокс ламінарний для стерильних робіт з горизонтальним потоком повітря;

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

– джерело постійного струму з напругою 150–600 В;

– дозатори автоматичні змінного об'єму;

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

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

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

– мішалка лабораторна електромагнітна з підігрівом;

– набір для вертикального електрофорезу;

– наконечники поліпропіленові для дозаторів змінного об'єму;

– система відео документування електрофореграм з програмним забезпеченням;

– термостат;

– термоциклер;

- УФ-бокс для полімеризації поліакріламідних гелів, які використовуються в аналізаторі ДНК, наприклад, Repro Set™ (Amersham Pharmacia Biotech, Швеція);
- флуорометр;
- шафа витяжна;
- рН-метр.

#### 4. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ

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

**Розчин натрію хлористого з молярною концентрацією 5 моль/л.**

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

**Розчин трису з молярною концентрацією 1 моль/л, рН 7,5.**

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

**Розчин трису з молярною концентрацією 1 моль/л, рН 8,5.**

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

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

Наважку Трилону Б масою 186,12 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють у 750 мл бідистильованої води, інтенсивно перемішують на електромагнітній мішалці. Доводять рН до 8,0 додаванням NaOH з масовою часткою 98,5 % (приблизно 40 г). Доводять показник рН до потрібного рН-метром, після чого додають бідистильовану воду до мітки.

### **Розчин ЦТАБ (лізуючий).**

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

### **Розчин протеїнази К з масовою часткою 20 мг/мл.**

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

### **Суміш хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1).**

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

### **Розчин етилового спирту з масовою часткою 70 %.**

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

### **Розчин ТЕ (трис-EDTA).**

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

### **Розчин TNE (трис-NaCl-EDTA) для вимірювання концентрації ДНК на флуорометрі.**

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

### **Розчин 10 х ТБЕ (трис-борат-EDTA).**

Наважки трису масою 108 г та-кислоти борної масою 55 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють у 800 мл бідистильованої води. Розчин збовтують на електромагнітній мішалці до повного розчинення трису та борної кислоти, після чого додають 40 мл розчину Трилону Б та доводять бідистильованою водою до мітки 1000 мл.

### **Розчин 1 х ТБЕ (трис-борат-EDTA).**

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

### **Розчин поліакриламідів з масовою часткою 30%.**

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

### **Розчин персульфату амонію (ПСА) з масовою часткою 10 %.**

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



### **Поліакриламідний гель (ПААГ) з масовою часткою 10 %.**

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

### **Розчин бромфенолового синього.**

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

### **Розчин ксиленціанолу.**

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

### **Розчин для нанесення.**

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

### **Розчин етилового спирту з масовою часткою 10 %.**

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

### **Розчин кислоти азотної з масовою часткою 1 %.**

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

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

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

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

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

### **Відновлювальний розчин.**

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

### **Розчин кислоти оцтової з масовою часткою 10 %.**

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

### **Розчин Bind-Silane для фіксації поліакриламідного гелю на склі.**

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

## **5. ЕТАПИ ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯ**

### *5.1. ВІДБІР ПРОБ ЗРАЗКІВ КАБАЧКА*

Відбирають середні (репрезентативні) проби, їх пакують, оформляють на зберігання згідно з ДСТУ 4138 [17]. Насіння, що відправляють на аналіз, обов'язково має бути здоровим, без теплового ушкодження під час сушіння, не заражене шкідниками, із запахом та кольором здорової насінини і супроводжуватися актом належної форми.

Кількість насінин, яку відбирають з середньої проби, що надійшла в лабораторію для ДНК-профілювання, має складатися з суміші 10 шт. зрілих насінин певного зразка кабачка, з якої потім виділяють ДНК.

### *5.2. ВИДІЛЕННЯ ДНК*

ДНК виділяють із суміші 10 зрілих насінин кожного колекційного зразка за допомогою набору для виділення ДНК "Diatom DNA Prep100". Для цього використовують лізуючий реагент із гуанідінхлоридом для сольобізації клітинного дебрису та денатурації клітинних нуклеаз. У присутності лізуючого реагенту ДНК сорбується на сіліка-сорбенті, відмивається від білків та солей спиртовим розчином.

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

#### *5.2.1 Підготовка до виділення ДНК*

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

#### *5.2.2. Процедура виділення та очищення ДНК*

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

закриванням кришок мікропробірок. Рослинний матеріал гомогенізують у мікропробірках скляною паличкою до повної мацерації тканин у 0,5 мл розчину ЦТАБ (лізуючому). Мікропробірки інкубують протягом 1 год. за 60 °С на водяній бані або в термостаті. До мікропробірок додають рівний об'єм суміші хлороформ-ізоміловий спирт, ретельно перемішують на вортексі протягом 1 хв. до утворення білої емульсії. Центрифугують 10 хв. у мікроцентрифузі за 13000 об./хв. для розподілу фаз. Відбирають верхній шар і переносять його у нову мікропробірку, промарковану відповідним номером. Додають рівний об'єм ізопропилового спирту, обережно перемішують і залишають на 20 хв. за кімнатної температури. Центрифугують протягом 5–10 хв. за 13000 об./хв. Рідину зливають. Осад промивають 1,0 мл розчину етилового спирту з об'ємною часткою 70 %. Центрифугують протягом 1 хв. у мікроцентрифузі за 13000 об./хв., спирт зливають. Мікропробірки з осадом залишають відкритими за кімнатної температури на 15 хв. Осад розчиняють у 0,3 мл розчину ТЕ.

### *5.3. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДНК*

Концентрацію виділеної ДНК рекомендовано визначати на флуорометрі «TKO100 DedicatedminiFluorometer» (HoferScientificInstruments, США) у TNE-буфері в присутності флуоресцентного барвника Hoechst 33258. До чистої кювети вносять 2 мл TNE-буфера, додають 2 мкл барвника Hoechst33258, перемішують, кювету вміщують у прилад, встановлюють на шкалі показник «0». До кювети додають 2 мкл розчину ДНК стандарту з концентрацією 100 нг/мкл, кювету вміщують у прилад, встановлюють на шкалі показник 100 нг/мкл. Вміст кювети видаляють, кювету промивають. До чистої кювети вносять 2 мл TNE-буфера, додають 2 мкл барвника Hoechst33258, перемішують, кювету вміщують у прилад та перевіряють його, показник має визначитися «0». До кювети вносять 2 мкл розчину ДНК зразка, перемішують, кювету вміщують у прилад, на шкалі його має з'явитися показник, що відповідає концентрації ДНК у зразка (нг/мкл). Концентрацію ДНК зразка фіксують у робочому журналі.

### *5.4. ЗБЕРІГАННЯ ПРОБ*

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

### *5.5. ВИМОГИ ЩОДО БЕЗПЕКИ*

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

## **6. ВИМОГИ ДО ПРИМІЩЕНЬ, ПОСУДУ ТА МАТЕРІАЛІВ**

Проведення ДНК-аналізу вимагає дотримання певних правил, обумовлених високою чутливістю методу.

В лабораторних приміщеннях 2 рази на тиждень стіни і підлогу миють розчином хлораміну Б з масовою часткою 1%. Робочі приміщення знезаражують за допомогою бактерицидних ламп протягом 30 хв. з максимумом випромінювання в області 260 нм, з розрахунку 2,5 Вт на 1 м<sup>3</sup>. Лампи повинні бути розташовані так, щоб прямому опромінюванню піддавалися поверхні робочих столів.

Усі етапи випробування проводити тільки з використанням одноразових матеріалів, що витрачаються: наконечників для автоматичних піпеток, пробірок, рукавичок тощо. Етапи прийому, реєстрації зразків і виділення ДНК, приготування ПЛР-суміші та ампліфікації повинні розміщуватись в різних приміщеннях. Виділення ДНК і приготування реакційних сумішей необхідно проводити в боксах для стерильних робіт.

Переміщення лабораторних журналів, посуду і матеріалів між зонами лабораторії не допускається.

## **7. ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР)**

Для проведення реакції ампліфікації підготовку реакційної суміші можна проводити двома способами.

Спосіб №1. Стерильні мікроцентрифужні пробірки необхідної кількості (об'ємом 0,2, 0,5 чи 1,5 мкл залежно від типу термоциклеру) розміщують в штативі, та маркують на пробірках номер зразку та праймер. В окремій мікроцентрифужній пробірці готують ПЛР-суміш. Компоненти у ПЛР-суміш додають у такій послідовності: деіонізована вода, 10<sup>x</sup> буфер для Таqполімерази, суміш dNTPs, прямий та зворотній праймери, ДНК-полімераза Таq. Суміш перемішують та розливають по відповідним мікроцентрифужним пробіркам. Відповідно до маркування додають по 3 мкл (30 нг) розчину виділеної ДНК. Поверх реакційної суміші нашаровують 25 мкл мінеральної олії, для запобігання википання компонентів.

Спосіб № 2. Ампліфікацію проводять з використанням наборів для ПЛР GenePak<sup>tm</sup> PCR Core (ТОВ “Лабораторія ИзоГен”, Росія). У пробірки із цих наборів, які містять ліофілізовані сухі реакційні суміші, готові для проведення ПЛР, додають 20 нг виділеної ДНК, 0,2 мк М праймера, потім реакційну суміш розчинником із наборів для ПЛР доводять до 20 мкл.

ПЛР проводять на 4-канальному термостаті ТП4-ПЦР-01-“Терцик” за таких умов: 1 цикл – денатурація при 94 °С – 5 хв.; 40 циклів: 94 °С – 40 с, відпал – 52 °С – 45 с, елонгація – 72 °С – 2 хв.; 1 цикл – фінальна елонгація, 72 °С – 7 хв.

### *7.1. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ, ВІЗУАЛІЗАЦІЯ ТА СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ ДНК*

Електрофорез продуктів ампліфікації проводять у 1,5 % агарозному гелі у присутності бромистого етидію. У роботі використовують Трис-ЕДТА-боратну буферну систему – 0,09 М Трис, 0,09 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,0031 М ЕДТА (рН 8,3). Візуалізацію спектрів проводять за допомогою транслюмінатора ТСП-20 МС з подальшим фотографуванням гелів. Як маркер для визначення розмірів ампліконів використовують Мcombі.

Розмір продуктів ампліфікації визначають за допомогою демоверсії програмного пакету TotalLabTL120 (<http://www.totallab.com>).

За результатами молекулярно-генетичного аналізу складають бінарні матриці для кожного праймера, у яких відмічають “наявність” (+) або “відсутність” (-) фрагментів з однаковою молекулярною масою на електрофореграмі. Кожний амплікон розглядають як окремий генетичний локус. Рівень поліморфізму для кожного праймера визначають як частку поліморфних локусів від загальної кількості локусів на праймер, виражену у відсотках. Внутрішньопопуляційний поліморфізм ДНК-маркерів розраховують як частку виявлених локусів у певного зразка кабачка від загальної кількості ідентифікованих локусів, виражену у відсотках. Аналіз генетичного різноманіття проводять за допомогою обчислення генетичних відстаней  $N_{ei}$ ,  $L_i$  ( $D_{ij}$ ) ( $N_{ei}$  and  $L_i$ , 1979) [18].

Обчислення генетичних відстаней проводять за допомогою пакету програм Phylip–3.69. Кластеризацію колекційних зразків і побудову філогенетичного дерева проводять методом приєднання сусідів (Neighbor-joining, NJ) за допомогою пакету програм Phylip–3.69. Достовірність отриманого філогенетичного дерева перевіряють за допомогою бутстреп-аналізу у 1000-разовій повторності.

### *7.2. ДОКУМЕНТУВАННЯ ТА КОНТРОЛЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ*

Відеозображення електрофореграм отримують за допомогою відео системи. Розміри алелів (у п. н.) визначають на підставі порівняння довжин пробігів ампліфікованих фрагментів з довжиною пробігу набору фрагментів відомого розміру стандартної ДНК за допомогою комп’ютерної програми.

Підчас електрофоретичного розподілу продуктів ПЛР в поліакриламідних гелях для продуктів кожної ПЛР відводять окрему доріжку в гелі. На кожному гелі проводити електрофоретичний розподіл фрагментів маркера молекулярної ваги в двох повтореннях. Відтворюваність результатів оцінюють для кожного зразка за всіма протестованими локусами шляхом порівняння розмірів алелів, отриманих в двох повтореннях ПЛР. В разі неспівпадіння розмірів алелів,

повторюють проведення аналізу. Поява трьох і більше смуг однакової інтенсивності в алельному діапазоні довжин свідчить про наявність у пробі домішок іншої ДНК. У таких випадках реакцію ампліфікації повторюють. За повторних незадовільних результатах знову виділяють ДНКта готують нові робочі розчини.

## **8. ОФОРМЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ**

Результати випробувань оформлюють в лабораторному журналі згідно додатку Ата в протоколі випробувань згідно з додатком Б.Для кожного опротестованого зразка складаються ідентифікаційні формули, в якій відображається алельний склад міжмікросателітних локусів.

Формули для кожного зразка записують та порівнюють між собою. У разі одноманітності формул всіх зразків записують ідентифікаційну формулу сорту чи гібриду, наданого для аналізу. У разі виявлення декількох варіантів формул вважають, що сорт (гібрид) складається з біотипів. Записують ідентифікаційні формули кожного біотипу та визначають їх відсоток.

## **9. ПРИКЛАД ПРОВЕДЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ЗРАЗКІВ КАБАЧКА**

Дослідження проводили у 2018 р. спільно на експериментальних базах Інституту овочівництва і баштанництва НААН та ТОВ “АГРОГЕН НОВО” (Харків, Україна). Вивчали 29 сортів і гібридів F<sub>1</sub>кабачка різного географічного походження (табл. 1). Представлена колекція залучена у створення нового селекційного матеріалу, стійкого до вірусу жовтої мозаїки кабачків.

Поліморфізм ДНК колекційних генотипів вивчали з використанням праймерів до міжмікросателітних послідовностей ISSR 2, ISSR 3, ISSR 4, ISSR 5, ISSR 7, ISSR 810, ISSR 12, ISSR 825, ISSR 826, ISSR 834, ISSR 842, ISSR 846 і ISSR 857 (UniversityofBritishColumbia, Canada) (табл. 2).

### *9.1. АНАЛІЗ ІНФОРМАТИВНИХ МОЖЛИВОСТЕЙ ВІДІБРАНИХ ISSRПРАЙМЕРІВ*

За результатами молекулярно-генетичного аналізу колекції кабачків ідентифіковано 129 ISSR-локусів, серед яких 109 були поліморфні. Продукти ампліфікації розрізнялися за кількістю, розміром і експресією. Детектовано 20 мономорфних локусів, які відмічено у всіх досліджуваних генотипів, зокрема за праймером ISSR4 виявлено мономорфний локус з розміром 523 п.н., за праймером ISSR5 – фрагменти розміром 438 і 614 п.н., за ISSR807 – 324, 491, 595 і 691 п.н., за ISSR810 – 277, 341 і 403 п.н., за ISSR812 – 504 і 579 п.н., за ISSR825 – 653 п.н., за ISSR826 – 393 і 515 п.н., за ISSR834 – 305 і 587 п.н., за ISSR842 – 328 і 394 п.н., за ISSR857 – 565 п.н. Також у деяких генотипів відмічено унікальні ділянки ДНК,

зокрема у гібриду Midnight F<sub>1</sub> виявлено локус ISSR 2<sub>935</sub>, у сорту Triestewhite half-long – ISSR 5<sub>579</sub>, у сорту Trombocino – локуси ISSR 2<sub>756</sub>, ISSR 2<sub>354</sub>, ISSR 2<sub>296</sub>, ISSR 807<sub>1260</sub>, ISSR 812<sub>1400</sub>, ISSR 826<sub>941</sub>, ISSR 842<sub>962</sub>, ISSR 846<sub>237</sub> і ISSR 857<sub>681</sub>. Ці локуси можуть бути використані для розробки більш специфічних маркерів, а також як маркери відповідних генотипів. Приклад електрофореграми наведено на рис. 1.

Встановлено значний рівень поліморфізму досліджуваних сортів і гібридів кабачка, який варіював від 62,5 % за праймером ISSR 810 до 100 % за праймерами ISSR 2, ISSR 3 і ISSR 846. Середній його рівень становив 83,6 %. Кількість та розміри знайдених фрагментів ДНК, а також рівень поліморфізму за кожним праймером наведено у таблиці 3. М. Esmailnia E.et. al. (2015) [12] і Katzir N. Et. al. (2000) [14] також відмічають високий рівень поліморфізму популяцій *Cucurbitarero* L. від 70 до 93 % залежно від праймера.

Таблиця 1. – Перелік колекційних зразків кабачка іноземної селекції, які було включено до молекулярного аналізу

№ з/п	Зразок	Країна походження
1	Alfresco F <sub>1</sub>	Великобританія
2	Best of British F <sub>1</sub>	Великобританія
3	Defender F <sub>1</sub>	Великобританія
4	Rimini F <sub>1</sub>	Великобританія
5	Patriot F <sub>1</sub>	Великобританія
6	Ambassador F <sub>1</sub>	Великобританія
7	Eight Ball F <sub>1</sub>	Великобританія
8	Midnight F <sub>1</sub>	Великобританія
9	Firenze F <sub>1</sub>	Великобританія
10	Tuscany F <sub>1</sub>	Великобританія
11	Parador F <sub>1</sub>	Великобританія
12	TZ 3089 (stripe) (вибірка з сорту)	Великобританія
13	Gold Rush F <sub>1</sub>	США
14	Afrodite F <sub>1</sub>	США
15	7003 F <sub>1</sub>	США
16	7006 F <sub>1</sub>	США
17	Celeste F <sub>1</sub>	Франція
18	Alexander F <sub>1</sub>	Іспанія
19	TZ 6390 F <sub>1</sub>	Іспанія
20	TZ 6391 F <sub>1</sub>	Іспанія
21	TZ 6392 F <sub>1</sub>	Іспанія
22	SV 1118 YG F <sub>1</sub>	США
23	сорт Verdedi Milano	Італія
24	сорт Triestewhite half-long	Італія

25	сорт Verdedi Italia Early	Італія
26	сорт Burpees Golden Zucchini	США (Пенсільванія)
27	сорт Striadodi Napoli	Італія
28	сорт Trombocino	Італія
29	сорт Чаклун	Україна

Таблиця 2. – Нуклеотидні послідовності ISSR праймерів \*

Праймер	Нуклеотидна послідовність 5'-3'	Праймер	Нуклеотидна послідовність 5'-3'
ISSR 2	(CA) <sub>8</sub> AG	ISSR 825	(AC) <sub>8</sub> T
ISSR 3	(CA) <sub>8</sub> GG	ISSR 826	(AC) <sub>8</sub> C
ISSR 4	(GA) <sub>8</sub> T	ISSR 834	(AG) <sub>8</sub> CTT
ISSR 5	(CA) <sub>8</sub> AC	ISSR 842	(GA) <sub>8</sub> CTG
ISSR 807	(AG) <sub>8</sub> T	ISSR 846	(CA) <sub>8</sub> RT
ISSR 810	(GA) <sub>8</sub> T	ISSR 857	(AC) <sub>8</sub> YG
ISSR 812	(GA) <sub>8</sub> A	-	-

Примітка. \* - Y = pyrimidine (C або T); R = purine (A або G).

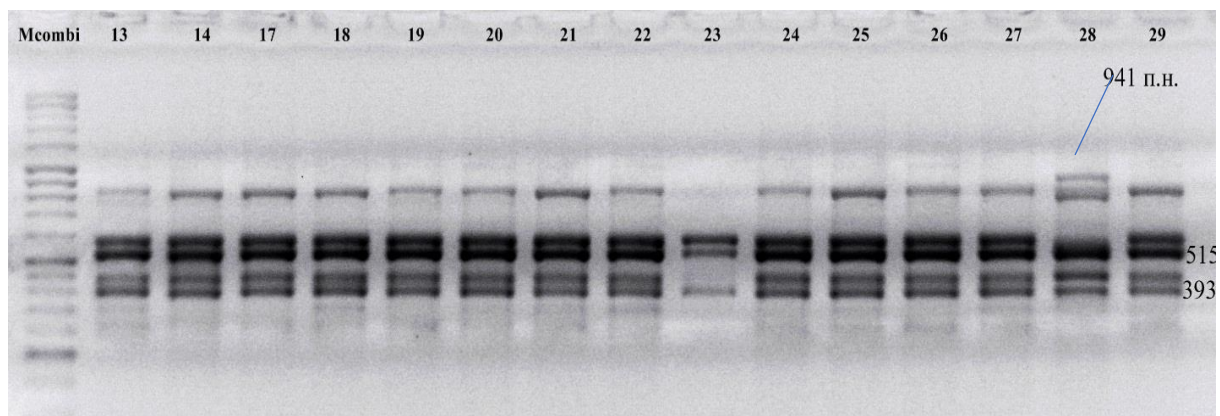


Рис. 1. – Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК колекції кабачків з праймером ISSR 826. Номери 13 – 29 відповідають сортозразкам у табл. 1. Mcombi – маркер розміру продуктів ампліфікації. Цифрами позначено мономорфні і унікальний фрагменти, п.н.

Таблиця 3. – Поліморфізм ДНК кабачка, виявлений з використанням ISSR-маркерів

Праймер	Кількість виявлених локусів, шт.	Кількість поліморфних локусів, шт.	Рівень поліморфізму, %	Розмір ампліконів, п.н.
ISSR 2	13	13	100,0	296–935
ISSR 3	11	11	100,0	373–812
ISSR 4	5	4	80,0	523–1195
ISSR 5	10	8	80,0	438–1313
ISSR 807	17	13	76,5	246–1260
ISSR 810	8	5	62,5	277–835



ISSR 812	13	11	84,6	378–1400
ISSR 825	8	7	87,5	243–653
ISSR 826	6	4	66,7	393–941
ISSR 834	12	10	83,3	253–1178
ISSR 842	9	7	77,8	250–962
ISSR 846	9	9	100,0	237–851
ISSR 857	8	7	87,5	361–681
Усього	129	73	$X_{сер} = 83,6$	–

Зазначимо також, що Xanthorouloul A. et. al (2015) [7] з використанням праймера ISSR 834 ідентифікували лише 7 локусів розміром 600–2700 п.н. і поліморфізмом 42,8 %, у той час як нами у результаті ампліфікації ДНК досліджуваних генотипів кабачка із цим праймером виявлено 12 локусів розміром 253–1178 п.н. і рівнем поліморфізму 83,3 %. Katzir N. et. al. (2000) [14] з використанням праймера ISSR 807 виявили 17 локусів (що узгоджується з отриманими нами даними) з поліморфізмом 70,6 %. Тоді як у нашому досліді поліморфізм за цим праймером становив 76,5 %. Також у роботі Katzir N. et. al. (2000) з використанням праймера ISSR 810 ідентифіковано 11 локусів з поліморфізмом 81,8 %, праймера ISSR 842 – 25 локусів з поліморфізмом 84,0 %. У наших дослідженнях з використанням цих праймерів детектовано лише по 9 локусів з поліморфізмом 62,5 і 77,8 %, відповідно. Розмір виявлених ампліконів автори зазначеної вище роботи не наводили, тому зіставити цю інформацію із наших даними неможливо. Розбіжності в одержаних результатах можуть бути викликані генетичними особливостями досліджуваного матеріалу, а також його походженням від генетично віддалених форм.

Внутрішньопопуляційний поліморфізм ДНК досліджуваної колекції кабачків залежав від генотипу і в середньому становив 58,9 %. Найбільше його значення (63,6 %) відмічено у гібрида Eight Ball F<sub>1</sub> у якого виявлено 82 із 129 можливих локусів, мінімальне – у гібрида Rimini F<sub>1</sub> (55,8 %, виявлено 72 локуси із 129 можливих) (табл. 4).

## 9.2. АНАЛІЗ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ЗВ'ЯЗКІВ МІЖ ПРОАНАЛІЗОВАНИМИ ГЕНОТИПАМИ КАБАЧКА ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОГО РОЗДІЛЕННЯ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ ISSR-ПРАЙМЕРІВ

За результатами розрахунку генетичних відстаней Nei, Li встановлено незначну генетичну дивергенцію між колекційними зразками *Cucurbita pepo* L. Найбільш генетично близькими виявилися гібриди Patriot F<sub>1</sub> (Великобританія) і Ambassador F<sub>1</sub> (Великобританія), генетична відстань між якими становила 0,0005. Максимальною генетичною дивергенцією характеризувалися сорт Trombosino (Італія) і гібрид 7006 F<sub>1</sub> (США),  $D_{ij} = 0,0092$ . Слід зазначити, що сорт Trombosino був найбільш генетично віддаленим відносно усіх колекційних зразків, показник  $D_{ij}$  у нього в середньому становив 0,0072, тоді як генетичні відстані між іншими зразками не перевищували 0,0060. Отримані результати можуть свідчити про значну генетичну подібність досліджуваних сортів і гібридів кабачка.

За результатами розрахунку генетичних відстаней Nei, Лі встановлено незначну генетичну дивергенцію між колекційними зразками *Cucurbita pepo* L. Найбільш генетично близькими виявилися гібриди Patriot F<sub>1</sub> (Великобританія) і Ambassador F<sub>1</sub> (Великобританія), генетична відстань між якими становила 0,0005. Максимальною генетичною дивергенцією характеризувалися сорт Trombocino (Італія) і гібрид 7006 F<sub>1</sub> (США),  $D_{ij} = 0,0092$ . Слід зазначити, що сорт Trombocino був найбільш генетично віддаленим відносно

Таблиця 4. – Поліморфізм ISSR-маркерів у колекційних зразків кабачків

№ з/п	Генотип	Кількість виявлених локусів		Рівень поліморфізму, %
		сумарна для всіх зразків, шт.	у певних зразків, шт.	
Сорти				
1.	TZ 3089 (stripe) (вибірка з сорту)	129	80	62
2.	Verde di Milano	129	75	58,1
3.	Trieste white half-long	129	74	57,4
4.	Verde di Italia	129	75	58,1
5.	Burpees Golden Zucchini	129	73	56,6
6.	Striado di Napoli	129	77	59,7
7.	Trombocino	129	74	57,4
8.	Чаклун	129	77	59,7
Гібриди F <sub>1</sub>				
9.	Alfresco F <sub>1</sub>	129	76	58,9
10.	Bestof British F <sub>1</sub>	129	74	57,4
11.	Defender F <sub>1</sub>	129	78	60,5
12.	Rimini F <sub>1</sub>	129	72	55,8
13.	Patriot F <sub>1</sub>	129	80	62
14.	Ambassador F <sub>1</sub>	129	80	62
15.	EightBall F <sub>1</sub>	129	82	63,6
16.	Midnight F <sub>1</sub>	129	75	58,1
17.	Firenze F <sub>1</sub>	129	77	59,7
18.	Tuscany F <sub>1</sub>	129	76	58,9
19.	Parador F <sub>1</sub>	129	77	59,7
20.	Gold Rush F <sub>1</sub>	129	77	59,7
21.	Afrodite F <sub>1</sub>	129	79	61,2
22.	7003 F <sub>1</sub>	129	77	59,7
23.	7006 F <sub>1</sub>	129	76	58,9
24.	Celeste F <sub>1</sub>	129	74	57,4
25.	Alexander F <sub>1</sub>	129	77	59,7
26.	TZ 6390 F <sub>1</sub>	129	74	57,4
27.	TZ 6391 F <sub>1</sub>	129	73	56,6
28.	TZ 6392 F <sub>1</sub>	129	73	56,6
29.	SV 1118 YG F <sub>1</sub>	129	73	56,6
$X_{med} =$				58,9

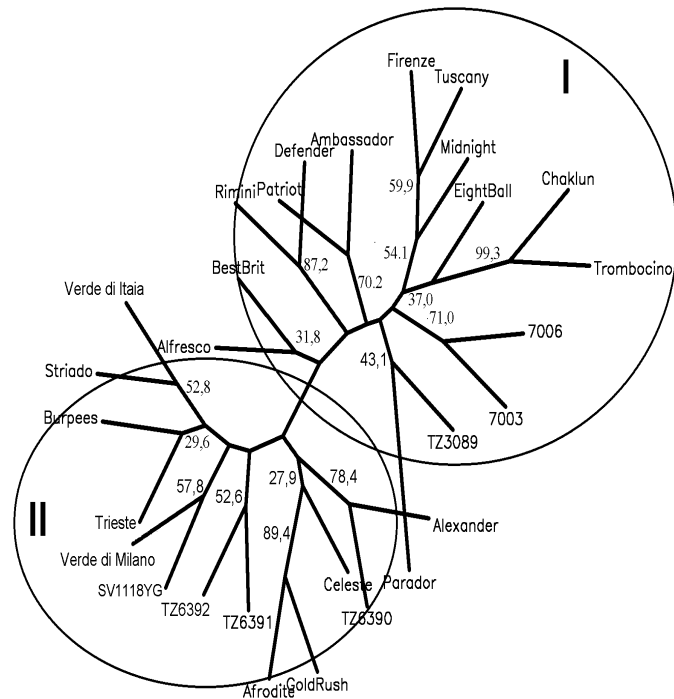


Рис. 2. – Дендрограма філогенетичних відносин між колекційними сортами і гібридами кабачка. I і II – кластери. Достовірність сформованих гілок вказано поруч із ними, %

усіх колекційних зразків, показник *Dij* у нього в середньому становив 0,0072, тоді як генетичні відстані між іншими зразками не перевищували 0,0060. Отримані результати можуть свідчити про значну генетичну подібність досліджуваних сортів і гібридів кабачка.

За результатами кластерного аналізу з використанням методу Neighborjoining було побудовано філогенетичне дерево (рис. 2).

Досліджувані сорти і гібриди кабачка кластеризувалися на дві групи. До першого кластеру увійшли всі сорти і гібриди походженням із Англії, а також сорти Trombocino (Італія), Чаклун (Україна), гібриди Ambassador F<sub>1</sub> (Великобританія), 7003 F<sub>1</sub> і 7006 F<sub>1</sub> (США). З високою імовірністю (за результатами бутстреп-аналізу) у межах першого кластера групувалися сорти Trombocino і Чаклун (99,3 %), гібриди Defender F<sub>1</sub> і Rimini F<sub>1</sub> (87,2 %), Patriot F<sub>1</sub> і Ambassador F<sub>1</sub> (70,2 %), 7003 і 7006 (71,0 %). Генетичні відстані (*Dij*) між цими зразками становили 0,0047, 0,0011, 0,0005 і 0,0010 відповідно. Інші гілки у першому кластері мали менші бутстреп-значення, що теоретично може призводити до іншої топології дерева, тобто до іншого групування генотипів у межах цього блоку.

Другий кластер містив різні за географічним походженням зразки. Зокрема 4 зразки із США (сорт Burpees Golden Zucchini, гібриди Gold Rush F<sub>1</sub>, Afrodite F<sub>1</sub>, SV 1118 YG F<sub>1</sub>), 4 гібриди із Іспанії (Alexander F<sub>1</sub>, TZ 6390 F<sub>1</sub>,

TZ 6391 F<sub>1</sub>, TZ 6392 F<sub>1</sub>), 4 сорти із Італії (Striadodi Napoli, VerdediItalia, Verdedi Milano, Triestewhite half-long), гібрид Celeste F<sub>1</sub> (Франція). Бутстреп-оцінка вузлів цього кластера показала високі значення для гілок, утворених гібридами Gold Rush F<sub>1</sub> і Afrodite F<sub>1</sub> (89,4 %,  $D_{ij}=0,0010$ ), Alexander F<sub>1</sub> і TZ 6390 F<sub>1</sub> (78,4 %,  $D_{ij}=0,0012$ ). Бутстреп-значення інших гілок другого кластера припускають можливість іншої топології.

У цілому за результатами вивчення колекції сортів і гібридів першого покоління (*Cucurbitarpeo* L.) різного географічного походження з використанням міжмікросателітних маркерів оцінено генетичну структуру використаних сортових і гібридних генотипів, встановлено високий внутрішньовидовий і міжпопуляційний генетичний поліморфізм і незначну генетичну дивергенцію між досліджуваними зразками. Виявлено унікальні послідовності ДНК, які можуть бути використані для паспортизації відповідних зразків, а також для розробки більш специфічних молекулярно-генетичних маркерів. Отримана інформація може бути корисною для оптимізації селекційного процесу кабачків, а також для подальших досліджень в області молекулярної генетики кабачка (*Cucurbitarpeo* L.).

## ДОДАТКИ

### ДОДАТОК А ОФОРМЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ В ЛАБОРАТОРНОМУ ЖУРНАЛІ

№ Протоколу випробувань \_\_\_\_\_  
Дата проведення випробувань \_\_\_\_\_  
Культура \_\_\_\_\_  
Назва сорту/лінії/гібрида \_\_\_\_\_  
Акт відбору \_\_\_\_\_  
Кількість досліджених насінин (зразків) \_\_\_\_\_

№ зразка	Повторення	Алелі міжмікросателітних локусів, п.н.				
		A*	B*	C*	D*	E*
1	I					
	II					
...	I					
	II					
100	I					
	II					

**Примітка:** \* – міжмікросателітні локуси згідно Додатку Б.

Виконавець \_\_\_\_\_

(Підпис)

ДОДАТОК Б  
**ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАНЬ СОРТІВ І ГІБРИДІВ №**

Назва лабораторії \_\_\_\_\_

Дата проведення випробувань \_\_\_\_\_

Культура \_\_\_\_\_

Назва сорту/лінії/гібрида \_\_\_\_\_

Акт відбору \_\_\_\_\_

Кількість досліджених насінин (зразків) \_\_\_\_\_

Формула зразка 1 \_\_\_\_\_

Формула зразка 100 \_\_\_\_\_

Виявлено \_\_\_\_\_ біотипів

Ідентифікаційна формула генотипу \_\_\_\_\_

(при наявності 1 біотипу)

Ідентифікаційна формула біотипу 1 \_\_\_\_\_

(при наявності 1 біотипу)

Ідентифікаційна формула біотипу n \_\_\_\_\_

(при наявності 1 біотипу)

Керівник лабораторії (директор) \_\_\_\_\_

(Підпис)

Виконавець \_\_\_\_\_

(Підпис)

Дата \_\_\_\_\_

М . П.

## БІБЛІОГРАФІЯ

1. Lanza L. L. B., Soura Jr. C. L., Ottobani L. M. N., Vieira M. L. and Souza A. P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997. V. 94. № 8. P 1023–1030.
2. Кожухова Н. Е., Захарова О. О. ДНК-маркери в насінництві кукурудзи. *Наукові праці Південного філіалу «Кримський Агротехнологічний Університет» НАУ*. 2008. Вип. 107. С. 142–144.
3. Вербицкая Т. Г., Кожухова Н. Э. Дифференциация линий кукурузы при помощи молекулярных маркеров. *Кукуруза и сорго*. 1997. N 6. С. 7–11.
4. Кожухова Н. Э., Требельский Д. Ю., Сиволап Ю. М. ПЦР-маркеры для исследования молекулярно-генетического полиморфизма кукурузы. *Актуальные проблемы генетики: тез. докл. 2-я конференции Московского общества генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова, посвященная 115-летию со дня рождения академика Н. И. Вавилова (Москва, 20–21 февраля 2003 г.)*. Москва, 2003. Т. 2. С. 138–139.
5. Леонова И. Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Том 17. № 2. С. 314–325.
6. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Том 17. № 4/2. С. 1044–1054.
7. Xanthopoulou A., Ganopoulos I., Kalivas A., Naniou-Obeidat I., Ralli P., Moysiadis T., Tsiftaris A., Madesis P. Comparative analysis of genetic diversity in Greek Genebank collection of summer squash (*Cucurbitapepo*) landraces using start codon targeted (SCoT) polymorphism and ISSR markers. *AJCS*. 2015. V. 9 (1). P. 14–21.
8. Gong L., Paris H. S., Nee M. H., Stift G., Pachner M., Vollmann J., Lelley T. Genetic relationship and evolution in *Cucurbitapepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms. *Theor Appl Genet*. 2011. doi: 10.1007/s00122-011-1752-z.
9. Abdel-Hamed K. E., Elwan M. W. M., Mohamed F. H. Genetic diversity and relationship in squash using morphological, chemical and molecular analyses. *International Journal of Horticulture*. 2015, V. 5, No.12. P. 1–10.
10. Brown R. N. The Use and Development of Molecular Breeding Tools in *Cucurbita*: A Literature Review. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*. 2001. V. 24. P. 87–90.
11. Ferriol M., Pico B., Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet*. 2003. Vol. 107. P. 271–282.
12. Esmailnia E., Arefrad M., Shabani S., Karimi M., Vafadar F., Dehestani A. Genetic diversity and phylogenetic relationship of Iranian indigenous cucurbits inves-

tigated by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Biharean Biologist*. 2015. Vol. 9 (1). P. 47–54.

13. Hadia H. A., Abdel-Razzak H. S., Hafez E. E. Assessment of genetic relationship samongand within cucurbita species using RAPD and ISSR markers. *Journal of Applied Sciences Research*. 2008. Vol. 4(5). P. 515–525.

14. Katzir N., Tadmor Y., Tzuri G., Leshxeshen E., Mozes-Daube N., Danin-Poleg Y., Paris H.S. Further ISSR and preliminary SSR analysis of relationships among accessions of *Cucurbita pepo*. *Acta Horticulturae*. 2000. V. 510, No. 69, P. 433–439.

15. Ntuli N. R., Tongoonab P. B., Zobolo A. M. Genetic diversity in *Cucurbitapepo* landraces revealed by RAPD and SSR markers. *ScientiaHorticulturae*. 2015. V. 189. P. 192–200.

16. RadwanS. A. Molecular disscrimintion and genetic relationships between some cultivars of *Cucurbitapepospp*, pepo using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Afr. J. of Biotechnology*. 2014. Vol. 13(11). P. 1202–1209. DOI: 10.5897/AJB2012.3007.

17. ДСТУ 4138-2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. Київ: Держстандарт України, 2003. 173 с.

18. Nei M., Li W.–H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. № 10. P. 5269–5273.