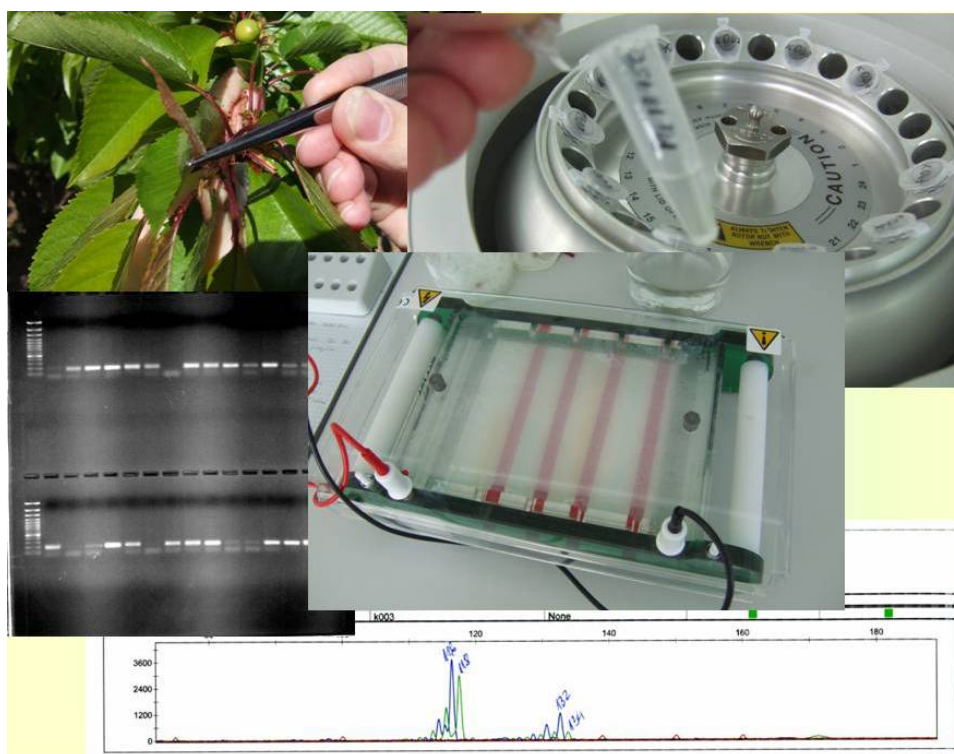


ATSKAITE

par subsīdiju projektu

Latvijas kultūraugu ģenētisko resursu molekulāri - ģenētiskā pasportizācija



Projekta vadītājs:

M.biol. Gunārs Lācis

tel.: 3722294

e-pasts: gunars.lacis@lvai.lv

www.lvai.lv

VA Latvijas Valsts augškopības Institūts

2006

Valsts aģentūras „Latvijas Valsts Augļkopības institūts” atskaite

par darbu pie MK 2006.gada 3.janvāra noteikumu Nr.21 „Noteikumi par valsts atbalstu lauksaimniecībai 2006.gadā un tā piešķiršanas kārtība” 4. pielikuma "Atbalsts izglītībai, zinātnei un informācijas izplatīšanai" V sadaļas "Atbalsts lauksaimniecībā izmantojamiem zinātnes projektiem" subsīdiju projekta „**Latvijas kultūraugu ģenētisko resursu molekulāri - ģenētiskā pasportizācija**" izpildi

Projekta konkrētie uzdevumi:

1. Izstrādāt molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodika sekojošām Latvijas kultūraugu kultūrām: kviešiem, sarkanajam āboliņam, kartupeļiem, ābelēm, melonēm un ģimenes sīpoliem.
2. Veikt molekulāri - ģenētiskā pasportizācija, izmantojot jau izstrādāto pasportizācijas metodiku šādām Latvijas kultūraugu kultūrām: miežiem un saldajiem ķiršiem.

Saskaņā ar Līgumu Nr. 220606/S311 tika veikts sekojošs darbs, atbilstoši projekta izvirzītajiem mērķiem un konkrētajiem uzdevumiem:

1. Molekulārās pasportizācijas metodikas ieviešana:

1.1. Kvieši

Saskaņā ar Pētījuma uzdevumu „Izstrādāt molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodiku kviešiem” veikts sekojošais:

a) Atlasīti kviešu paraugi, ar kuriem veikt informatīvo marķieru noteikšanu un atlasīti:

- Banga (šķirne, ziemas kvieši)
- Krista (šķirne, ziemas kvieši)
- Moda (šķirne, ziemas kvieši)
- Sakta (šķirne, ziemas kvieši)
- Viesturu (šķirne, ziemas kvieši)
- Std 91-13-31 (selekcijas līnija, vasaras kvieši)
- L 93-130 (selekcijas līnija, ziemas kvieši)

Paraugu atlases kritēriji bija:

- Latvijas izcelsme
- dažādu vecākformu klātbūtne ciltskokā
- dažāds fizioloģiskais tips

b) Pēc literatūras analīzes tika atlasīti 20 mikrosatelītu praimeru pāri (praimeru pāri) molekulārās pasportizācijas metodikas izstrādāšanai kviešiem. To atlases kritēriji bija:

- augsts polimorfisms pārbaudītām šķirnēm;
- maksimāli iespējams genoma pārklājums;
- atšķirīgi sagaidāmie produkta garumi.

c) Tika veikta atlasīto paraugu diedzēšana un DNS izdalīšana. Izmantojot izdalīto DNS tika izstrādāta molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodika (1. pielikums).

1.2. Āboliņš

Saskaņā ar Pētījuma uzdevumu „Izstrādāt molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodiku sarkanam āboliņam” veikts sekojošais:

a) Atlasīti sarkanā āboliņa paraugi, ar kuriem veikt informatīvo marķieru noteikšanu un metodikas ieviešanu:

- Stendes vēlais 2n
- Ārija 2n
- Jancis 2n
- Skrīveru agrais 2n
- Kaive 4n
- Skrīveru tetra 4n
- Dīvaja 4n
- Stendes agrais 2n
- Dižstende 2n

Paraugu atlasē kritēriji bija:

- Latvijas izcelsme
- dažādu vecākformu klātbūtne ciltskokā
- dažāda ploīditāte

b) Pēc literatūras analīzes atlasīti 20 mikrosatelītu praīmeri (praīmeru pāri) molekulārās pasportizācijas metodikas izstrādāšanai sarkanam āboliņam.

Praīmeru pāru atlasē kritēriji bija:

- augsts polimorfisms pārbaudītām šķirnēm;
- maksimāli iespējams genoma pārklājums;
- atšķirīgi sagaidāmie produkta garumi.

c) Tika veikta atlasīto paraugu diedzēšana un DNS izdalīšana. Izmantojot izdalīto DNS tika izstrādāta molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodika (2. pielikums).

1.3. Kartupeļi

Metodikas izstrādei kartupeļu ģenētisko resursu molekulāri ģenētiskajai pasportizācijai izvēlētas 10 Latvijā izaudzētas šķirnes:

1. Zīle (Meta/ Maris Piper);
2. Agra (M1067.5/522.183);
3. Monta (16934.1/Ausonia)
4. Izstādes (V5018-2/Agra)
5. Gauja (Lawa/10792.2);
6. Sarmiņa (Gauja/Sedņevskij raņņij);
7. Māris (12352.1/Gauja);
8. Eksports (Primadonna/Pepo);
9. Laimdota (Majestic/Eksports);
10. Lauma (izlase no Fanal)

Lai pēc iespējas labāk varētu novērtēt atlasītos praimerus un izstrādātu metodiku, izvēlētas kartupeļu šķirnes, kas ir gan tuvu radniecīgas, gan šķirnes, kurām ir neradnieciska izcelsme.

Tuvu radniecīgu šķirņu grupu veido 1940. gadā izveidotā šķirne ‘**Agra**’ (1679.9 x 522.183) un divas šķirnes, kuras atlasītas no krustojumu kombinācijām ar šķirni ‘Agra’: ‘Izstādes’ (šķirne reģistrēta 1953. gadā, krustojuma kombinācija V5018-2 x ‘**Agra**’) un Monta (2000., krustojuma kombinācija 16934.1 [15702.66 (Omega x **Agra**) x Jasen] x Ausonia).

Otru radniecīgu šķirņu grupu veido šķirne ‘**Gauja**’ (1978. gads, ‘Lawa’ x 10792.2) ar savām pēcnācējām šķirnēm ‘Sarmiņa’ (1980., ‘**Gauja**’ x ‘Sedņevskij Raņņij’) un ‘Māris’ (1992. 12352.1 x ‘**Gauja**’).

Izmēģinājumā iekļauta šķirne ‘**Eksports**’ (izaudzēta 1926.gadā, krustojuma kombinācija ‘Primadonna’ x ‘Pepo’) un tās pēctece šķirne ‘Laimdota’ (1933., ‘Majestic’ x ‘**Eksports**’). Pilnīgi atšķirīga izcelsme ir šķirnei ‘Zīle’ (reģistrēta 1989., ‘Meta’ x ‘Maris Piper’). Šķirne ‘Lauma’ (1984.) izveidota izlases ceļā no vācu šķirnes ‘Fanal’, abas šķirnes iekļautas pētījumā, lai noskaidrotu, vai to genotipi atšķiras.

Tika veikta DNS izdalīšana. Izmantojot izdalīto DNS tika izstrādāta molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodika (3. pielikums).

1.4. Ābeles

Saskaņā ar Pētījuma uzdevumu „Izstrādāt molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodiku ābelēm” atskaites periodā ir veikts sekojošais:

a) Atlasīti 6 ābeļu paraugi, ar kuriem veikta informatīvo marķieru noteikšana, metodikas ieviešana:

- *Malus silvestris* Mill.
- Baltais Dzidrais (Šoha klona)
- Prima (*Vf*)
- Sīpoliņš
- McIntosh
- Wijcik (*Co*)

Paraugu atlases kritēriji bija:

- Latvijas izcelsme;
- Latvijas teritorijai raksturīga savvaļas suga;
- Specifisku, selekcijai svarīgu gēnu esamība (*Vf* – kraupja rezistences gēns, *Co* – kolonveida vainaga formu nosakošais gēns);
- Plašs pielietojums krustojumos;
- Potenciāla ģenētiskā daudzveidība.

b) Pēc literatūras analīzes atlasīti 18 mikrosatelītu praimeru (praimeru pāri) molekulārās pasportizācijas metodikas izstrādāšanai ābelēm.

Praimeru atlases kritēriji:

- augsts polimorfisms pārbaudītām šķirnēm;
- maksimāli iespējams genoma pārklājums;
- atšķirīgi sagaidāmie produkta garumi.

c) Tika veikta DNS izdalīšana izvēlētajiem paraugiem. Izmantojot izdalīto DNS tika izstrādāta molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodika (4. pielikums).

1.5. Ģimenes sīpoli

Ģimenes sīpolu molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodikas izstrādei izvēlēti Latvijas vietējie kloni un šķirnes ar dažādu krāsu un sīpolu formu (25, 31,47,649,294, 574, 659, Kapiņa).

Veikta atlasīto paraugu DNS izdalīšana. Izmantojot izdalīto DNS tika izstrādāta molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodika (5. pielikums).

1.6. Melones

Meloņu molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodikas izstrādei izvēlētas līnijas, kurām kopš 2003. gada tiek veikta tuvradnieciska krustošana, un kuras uz šo brīdi ir uzskatāmas par salīdzinoši homogēnām un kvalitātes prasībām atbilstošām Latgales melonēm (5(2) I2, 4(3)I3, 8 I2, S4(3)I2, 4(3)I2B, Piļkas ribotā līnija), kā arī lielākai genotipiskajai daudzveidībai, kura nepieciešama praimeru polimorfisma noteikšanai, izmēģinājumā iekļautas arī dienvideiropas un Japānas selekcijas meloņu šķirnes (Ogen un Katsura Gigant).

Tika veikta atlasīto paraugu DNS izdalīšana. Izmantojot izdalīto DNS tika izstrādāta molekulāri - ģenētiskās pasportizācijas metodika (6. pielikums).

2. Molekulārās pasportizācijas veikšana:

2.1. Mieži

Saskaņā ar Pētījuma uzdevumu „Veikt molekulāri - ģenētiskā pasportizāciju miežiem, izmantojot jau izstrādāto pasportizācijas metodiku” atskaites periodā ir veikts sekojošais:

Atlasīti 25 miežu paraugi, kuriem veikt molekulāri - ģenētiskā pasportizāciju, pasportizācijas rezultāti – 8. pielikumā.

Šķirņu atlases kritēriji:

- visas pieejamās Latvijas izcelsmes miežu šķirnes;
- perspektīvākās selekcijas līnijas.

b) Balstoties uz laboratorijas iepriekšējo pieredzi atlasīti 10 mikrosatelītu praimeru (praimeru pāri), ar kuriem veikt molekulāri - ģenētisko pasportizāciju.

Praimeru atlases kritēriji:

- augsts polimorfisms iepriekšējos izmēģinājumos;
- maksimāli iespējams genoma pārklājums;
- atšķirīgi sagaidāmie produkta garumi

c) Izvēlēti četri PCR protokoli, kuri parādīja augstāko efektivitāti atlasītiem praimeriem (metodikas apraksts 7.pielikumā).

d) Veikta atlasīto paraugu diedzēšana DNS izdalīšanai. Tika veikta atlasīto paraugu DNS izdalīšana. Izmantojot izdalīto DNS tika veikta molekulāri - ģenētiskās pasportizācija (8. pielikums).

2.2. Saldie ķirši

Saskaņā ar Pētījuma uzdevumu „Veikt molekulāri - ģenētiskā pasportizāciju saldajiem ķiršiem, izmantojot jau izstrādāto pasportizācijas metodiku” atskaites periodā ir veikts sekojošais:

a) Atlasīti saldo ķiršu paraugi, kuriem veikt molekulāri - ģenētiskā pasportizāciju, pasportizācijas rezultāti – 10. pielikumā.

Šķirņu atlases kritēriji:

- Latvijas izcelsmes saldo ķiršu ģenētisko resursu paraugi;
- Ārzemju šķirnes, kas ir nozīmīgs saldo ķiršu selekcijas izejmateriāls;
- AVS testam nepieciešamās šķirnes, padziļinātas šķirņu identifikācijas un salīdzināšanas veikšanai.

b) Balstoties uz iepriekšējo pieredzi atlasīti 10 mikrosatelītu praimeru (praimeru pāri), ar kuriem veikta molekulāri - ģenētiskā pasportizācija.

Praimeru atlases kritēriji:

- augsts polimorfisms iepriekšējos izmēģinājumos;
- maksimāli iespējams genoma pārklājums;
- atšķirīgi sagaidāmie produkta garumi.

c) Izvēlēts PCR protokols, kurš parādījis augstāko efektivitāti atlasītiem praimeru pāriem (metodikas apraksts 9.pielikumā).

d) Veikta atlasīto paraugu diedzēšana DNS izdalīšanai. Tika veikta atlasīto paraugu DNS izdalīšana. Izmantojot izdalīto DNS tika veikta molekulāri - ģenētiskā pasportizācija (10. pielikums).

Secinājumi

1. Izstrādātas molekulāri – ģenētiskās pasportizācijas metodikas kviešiem, sarkanajam āboliņam, kartupeļiem, ābelēm, melonēm un ģimenes sīpoliem, kas ļauj veikt ģenētisko resursu paraugu identificēšanu;
2. Izstrādātās metodikas pielietojamas tālākai kviešu, sarkanā āboliņa, kartupeļu, ābeļu, meloņu un ģimenes sīpolu ģenētisko resursu kolekciju pasportizācijai, izmantojot mikrosatelītu (SSR) marķierus;
3. Izstrādātās un ieviestās mikrosatelītu (SSR) metodikas nodrošina stabilu un atkārtojamu rezultātu iegūšanu, kas ļauj veikt iegūto datu salīdzināšanu ar citās valstīs iegūtajiem rezultātiem, iegūto datu apmaiņu un analīzi, izvietošanu ģenētisko resursu datu bāzēs;
4. Izmantojot jau izstrādātās metodikas, iegūti ģenētisko resursu paraugu identificēšanai nepieciešamie molekulāri - ģenētiskie profili miežiem un saldajiem ķiršiem.
5. Iegūtie rezultāti izmantojami tālākai miežu un saldo ķiršu kolekciju analīzei – nosakot paraugu radniecību, atlasot dublikātus, ģenētiski tuvu radniecīgas šķirnes;
6. Iegūtā molekulāri – ģenētiskās pasportizācijas informācija ir nozīmīga sekmīgai un optimālai ģenētisko resursu kolekciju uzturēšanai, starptautiskai informācijas

izplatīšanai par Latvijas kultūraugu ģenētiskajiem resursiem, kā arī esošo selekcijas programmu uzlabošanai un intensificēšanai.

Atsakaitei pievienots:

1. Finanšu atskaite
2. Reģistrācijas apliecības kopija

LV Augļkopības institūta direktore:

Edīte Kaufmane

Projekta vadītājs:

Gunārs Lācis

Apstiprināts:

ZM lauksaimniecības departamenta direktore:

Helma Jirgena

Lauku atbalsta dienesta atbildīgā persona

Valsts aģentūras „Latvijas Valsts Augļkopības institūts”

MK 2006.gada 3.janvāra noteikumu Nr.21 „Noteikumi par valsts atbalstu lauksaimniecībai 2006.gadā un tā piešķiršanas kārtība” 4. pielikuma "Atbalsts izglītībai, zinātnei un informācijas izplatīšanai" V sadaļas "Atbalsts lauksaimniecībā izmantojamiem zinātnes projektiem" subsīdiu projekts

„Latvijas kultūraugu ģenētisko resursu molekulāri - ģenētiskā pasportizācija”

Kopsavilkums

Projektam tika izvirzīti sekojoši konkrētie uzdevumi: 1) Izstrādāt molekulāri – ģenētiskās pasportizācijas metodika sekojošām Latvijas kultūraugu kultūrām: kviešiem, sarkanajam āboliņam, kartupeļiem, ābelēm, melonēm un ģimenes sīpoliem; 2) Veikt molekulāri - ģenētiskā pasportizācija, izmantojot jau izstrādāto pasportizācijas metodiku šādām Latvijas kultūraugu kultūrām: miežiem un saldajiem ķiršiem.

Lai izstrādātu molekulāri – ģenētiskās pasportizācijas metodiku tika veikta literatūras analīze, atlasot piemērotākos mikrosatelītu (SSR) praimerus jeb marķierus attiecīgajām kultūrām. Atlases kritēriji bija praimeru polimorfisms, apmlicējamo alēļu skaits (izvēloties lielāko skaitu), lokalizācija genomā (priekšroku dodot marķieriem, kas lokalizēti dažādās hromosomās). Pēc literatūras datiem tika izvēlēti 20 mikrosatelītu marķieri kviešiem, āboliņam, kartupeļiem, ģimenes sīpoliem un melonēm, 16 mikrosatelītu marķieri ābelēm. Papildus mikrosatelītu marķieriem, ābelēm kā saimnieciski un selekcijai nozīmīgs, tika izmantots specifiska gēna (kraupja rezistences jeb *Vf* gēna) marķieris

Izmantojot izvēlētos mikrosatelītu marķierus tika veikts eksperimentālais darbs metodiku izstrādei un ieviešanai Latvijā, izmantojot un modificējot publicētos protokolus. Eksperimentālajā darbā tika izmantotas 7 kviešu, 9 āboliņa, 10 kartupeļu, 6 ābeļu, 8 ģimenes sīpolu un 9 meloņu šķirnes. Izmantojamo šķirņu galvenie atlases kritēriji bija: Latvijas izcelsme, specifisku, selekcijai svarīgu gēnu esamība, pielietojums Latvijā veiktajos krustojumos, potenciāla ģenētiskā daudzveidība.

Eksperimentālā darba rezultātā tika izstrādātas laboratorijas metodikas ģenētiski – molekulārajai pasportizācijai kviešu, sarkanā āboliņa, kartupeļu, ābeļu, meloņu un ģimenes sīpolu ģenētiskajiem resursiem. Izstrādātās metodikas tiks pielietotas turpmākajā kultūraugu ģenētisko resursu pasportizācijā.

Balstoties uz jau izstrādātajām metodikām tika veikta miežu (25 šķirnes) un saldo ķiršu (146 šķirnes) molekulāri ģenētiskā pasportizācija. Abām pētāmajām kultūrām tika izmantots 10 mikrosatelītu praimeru pāru komplekts. Izpētē izmantoti 2 PCR (polimerāzes ķēdes reakcijas) protokoli saldajiem ķiršiem un 4 – miežiem.

Eksperimentālais darbs veikts Valsts aģentūras „Latvijas Valsts Augļkopības institūta” molekulārās bioloģijas laboratorijā, kā arī VMZI „SILAVA” molekulārās pasportizācijas laboratorijā, SIA Pūres dārkopības pētījumu centrā un LU aģentūras „LU Bioloģijas institūts” Augu ģenētikas laboratorijā, sadarbībā ar attiecīgo kultūru selekcijas institūtiem: Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtu, Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūtu un LLU aģentūru „Zemkopības Zinātniskais institūts”.

PIELIKUMS

**Kviešu (*Triticum*) šķirņu
molekulārās pasportizācijas
metodika**

Valsts aģentūra „Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūts”
LU aģentūra „LU Bioloģijas institūts”

2006

Kviešu šķirņu molekulārai pasportizācijai tiek lietota vienkāršo sekvenču atkārtošanas (SSR, simple sequence repeats) marķieru metode.

No katras sarkanā kviešu šķirnes tiek izdalīta DNS, kura tiek testēta ar 20 šajā metodē lietotajiem praimeriem pāriem PCR (polymerase chain reaction) reakcijā, kuras produktu lokusu alēļu kombinācijas raksturo attiecīgo šķirni.

1. DNS izdalīšana

Paraugu sagatavošana

DNS tika izdalīta no otrās jeb trešās lapas audiem, ko ieguva no divu nedēļu veciem izdiedzētiem augiem. No katras šķirnes tika atsevišķi ievākti paraugi no 8 indivīdiem. Lapu paraugi tika ievākti 96 paraugu DNS uzglabāšanas platēs un sasaldēti šķidrā slāpekļī. Pēc sasaldēšanas tos ievietoja Luo Lab 3000 saldējošā vakuuma žāvētājā un žāvēja četras diennaktis pie -60°C temperatūras. Izzāvētos paraugus sasmalcināja izmantojot Retsch kratītāju un svina lodītes.

DNS izdalīšanai izmantotais protokols:

Pie katra sasmalcinātā parauga tika pievienots 600 μl CTAB bufera (0.1M Tris, pH8.0; 0.01M EDTA, 0.7M NaCl, 1% CTAB un 1% merkaptotanolis) un tad vienu stundu izturēts pie 60°C ūdens vannā. Ekstrakcija tika turpināta pievienojot 600 μl hloroforma-izoamilalkohola, tilpuma attiecībās 24:1, un uzmanīgi samaisot, tad plates tika centrifugētas 20 min. pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas šķidrā fāzē no katra parauga tika pārnesta uz jaunu plati, kur tai pievienoja 5 μl Rnāzi (1mg/ml) un inkubēja 30 min pie 37°C . Pēc inkubēšanas pievienoja 0.8 tilpumu auksta izopropanola un uzmanīgi maisīja, tad centrifugēja 10 min pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernatantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā. DNS skaloja ar 76% etanola un 0.2M nātrija acetāta šķīdumu uzmanīgi maisot 20 min istabas temperatūrā un tad centrifugēja 5 min. pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernatantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā. DNS skaloja ar 76% etanola un 0.01M amonija acetāta šķīdumu un centrifugēja 5 min pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernatantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā, izžāvēja paraugu istabas temperatūrā un izšķīdināja plates stobriņa apakšā esošo DNS 50 μl TE bufferī (0.01M Tris pH 8.0; 1mM EDTA, pH 8.0).

DNS kvalitātes un kvantitātes noteikšana

Lai pārlicinātos par DNS esamību, kā arī noteiktu vai tās kvalitāte un kvantitāte ir pieņemama lai turpinātu darbu ar mikrosatelītu polimerāzes ķēdes reakcijām (PCR), tika izmantots Eppendorf BioPhotometer (Quantitative analysis).

2. PCR protokoli un mikrosatelītu praimeru sekvences.

Tika izvēlēti divdesmit mikrosatelītu praimeru pāri (1. tabula). Pie R praimera sekvencēm tika pievienotas fluorescentās krāsvielas.

1. tabula. Izvēlētie praimeru sekvences atstrādāšanai kviešiem

Nr	Nosaukums	sekvenca	atkārtojums	p. temp. °C
1	<i>Xgwm47</i> L	TTG CTA CCA TGC ATG ACC AT	(CT) ₇ TT(CT) ₁₆	60
	<i>Xgwm47</i> R	TTC ACC TCG ATT GAG GTC CT		
2	<i>Xgwm111</i> L	TCT GTA GGC TCT CTC CGA CTG	(CT) ₃₂ (GT) ₁₇	55
	<i>Xgwm111</i> R	ACC TGA TCA GAT CCC ACT CG		
3	<i>Xgwm120</i> L	GAT CCA CCT TCC TCT CTC TC	(CT) ₁₁ (CA) ₁₈	60
	<i>Xgwm120</i> R	GAT TAT ACT GGT GCC GAA AC		
4	<i>Xgwm121</i> L	TCC TCT ACA AAC AAA CAC AC	(CAAA) ₂ (CA) ₂₈	50
	<i>Xgwm121</i> R	CTC GCA ACT AGA GGT GTA TG		
5	<i>Xgwm131</i> L	AAT CCC CAC CGA TTC TTC TC	(CT) ₂₂	60
	<i>Xgwm131</i> R	AGT TCG TGG GTC TCT GAT GG		
6	<i>Xgwm136</i> L	GAC AGC ACC TTG CCC TTT G	(CT) ₅₈	60
	<i>Xgwm136</i> R	CAT CGG CAA CAT GCT CAT C		
7	<i>Xgwm148</i> L	GTG AGG CAG CAA GAG AGA AA	(CA) ₂₂	60
	<i>Xgwm148</i> R	CAA AGC TTG ACT CAG ACC AAA		
8	<i>Xgwm164</i> L	ACA TTT CTC CCC CAT CGT C	(CT) ₁₆	55
	<i>Xgwm164</i> R	TTG TAA ACA AAT CGC ATG CG		
9	<i>Xgwm186</i> L	GCA GAG CCT GGT TCA AAA AG	(GA) ₂₆	60
	<i>Xgwm186</i> R	CGC CTC TAG CGA GAG CTA TG		
10	<i>Xgwm219</i> L	GAT GAG CGA CAC CTA GCC TC	(GA) _{35imp}	60
	<i>Xgwm219</i> R	GGG GTC CGA GTC CAC AAC		
11	<i>Xgwm259</i> L	AGG GAA AAG ACA TCT TTT TTT TC	(GA) ₁₇	55
	<i>Xgwm259</i> R	CGA CCG ACT TCG GGT TC		
12	<i>Xgwm260</i> L	GCC CCC TTG CAC AA TC	(GA) ₂₀	55
	<i>Xgwm260</i> R	CGC AGC TAC AGG AGG CC		
13	<i>Xgwm294</i> L	GGA TTG GAG TTA AGA GAG AAC CG	(GA) ₉ TA(GA) ₁₅	55
	<i>Xgwm294</i> R	GCA GAG TGA TCA ATG CCA GA		
14	<i>Xgwm299</i> L	ACT ACT TAG GCC TCC CGC C	(GA) ₃ (TAG) ₄	55
	<i>Xgwm299</i> R	TGA CCC ACT TGC AAT TCA TC		
15	<i>Xgwm325</i> L	TTT CTT CTG TCG TTC TCT TCC C	(CT) ₁₆	60
	<i>Xgwm325</i> R	TTT TTA CGC GTC AAC GAC G		
16	<i>Xgwm332</i> L	AGC CAG CAA GTC ACC AAA AC	(GA) ₃₆	60
	<i>Xgwm332</i> R	AGT GCT GGA AAG AGT AGT GAA GC		
17	<i>Xgwm369</i> L	CTG CAG GCC ATG ATG ATG	(CT) ₁₁ (T) ₂ (CT) ₂₁	60
	<i>Xgwm369</i> R	ACC GTG GGT GTT GTG AGC		
18	<i>Xgwm427</i> L	AAA CTT AGA ACT GTA ATT TCA GA	(CA) ₃₁ (CA) ₂₂	50
	<i>Xgwm427</i> R	AGT GTG TTC ATT TGA CAG TT		
19	<i>Xgwm437</i> L	GAT CAA GAC TTT TGT ATC TCT C	(CT) ₂₄	50
	<i>Xgwm437</i> R	GAT GTC CAA CAG TTA GCT TA		
20	<i>Xgwm539</i> L	CTG CTC TAA GAT TCA TGC AAC C	(GA) ₂₇	60
	<i>Xgwm539</i> R	GAG GCT TGT GCC CTC TGT AG		

PCR protokoli

Katra PCR reakcija tika veikta 20 µl tilpumā, kas saturēja 10.5 µl dejonizēta ūdens, 2 µl PCR 10x bufera (Fermentas), 2 µl MgCl₂ (Fermentas), 0.5 µM F praimera, 0.5 µM ar florescentu krāsu iezīmētā R praimera, 0.2 mM katra d’NTP, 0.5 U Taq polimerāzes (Fermentas) and 10-20 ng parauga DNS (1 µl tilpums). PCR reakcijas apstākļi tika izmantoti kā Röder et al. (1998).

Rezultātu analīze

No analizētajiem marķieriem četriem neizdevās amplificēt produktu: Xwgm120, Xwgm121, Xwgm136 un Xwgm164. Šie marķieri turpmāk netiks apskatīti.

No katras šķirnes tika analizēti divi indivīdi. Vidēji katram lokusam tika konstatētas 7 alēles, t.i. no 1 alēles līdz 10 alēlēm (1. tabula). Alēļu sastāvs katram indivīdam pie katra lokusa parādīts pielikuma tabulā (1b. tabula). Divdesmit lokusi analizētajos paraugos bija polimorfi.

2. tabula. Mikrosatelītu lokusu alēļu skaits un izmēri

Mikrosatelīta lokus	Alēļu skaits	Alēļu izmēri (bp)
<i>Xgwm47</i>	6	141, 145, 149, 151, 164 un 166
<i>Xgwm111 L1</i>	4	126, 128, 130 un 143
<i>Xgwm111 L2</i>	8	174, 176, 178, 188, 194, 196, 200 un 202
<i>Xgwm131 L1</i>	2	113, 118
<i>Xgwm131 L2</i>	5	133, 146, 148, 150 un 152
<i>Xgwm148</i>	6	120, 122, 124, 127, 128 un 138
<i>Xgwm186 L1</i>	1	132
<i>Xgwm186 L2</i>	6	140, 145, 161, 162, 164 un 166
<i>Xgwm219</i>	10	147, 162, 163, 166, 178, 188, 189, 190, 195 un 197
<i>Xgwm259</i>	4	101, 103, 105 un 107
<i>Xgwm260 L1</i>	1	132
<i>Xgwm260 L2</i>	3	162, 164 un 166
<i>Xgwm260 L3</i>	1	268
<i>Xgwm294</i>	4	130, 132, 138 un 140
<i>Xgwm299</i>	3	201, 203 un 205
<i>Xgwm325</i>	6	69, 81, 91, 94, 100 un 111
<i>Xgwm332 L1</i>	4	191, 193, 195 un 197
<i>Xgwm332 L2</i>	3	200, 219 un 221
<i>Xgwm369</i>	5	184, 186, 192, 210 un 212
<i>Xgwm427 L1</i>	3	114, 116 un 117
<i>Xgwm427 L2</i>	4	216, 219, 221 un 223
<i>Xgwm437</i>	9	131, 132, 133, 135, 139, 156, 161, 163 un 166
<i>Xgwm539</i>	8	103, 105, 109, 111, 113, 115, 118 un 123

Atsauces

Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixer M.H., Leroy P. Un M.W. Ganal (1998). ‘A microsatellite map of wheat’ *Genetics* 149, 1-10.

3. tabula. Lokusi un alēles analizēto kviešu mikrosatelītiem

Marķieris	Šķirne/līnija	31-1331		93-130		Banga		Kozak		Krista		Moda		Sakta		Viesturu		Vinjet		Zentos		
	Indivīds	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Xgwm294	Alēle 1	*	138	*	*	140	*	*	138	*	130	*	138	*	*	140	*	132	132	138	*	
	Alēle 2	*	138	*	*	140	*	*	138	*	130	*	138	*	*	140	*	132	132	138	*	
Xgwm325	Alēle 1	91	91	100	100	91	91	94	94	91	69	94	94	69	91	93	94	91	91	81	81	
	Alēle 2	91	91	100	100	91	91	111	94	91	69	94	94	69	91	93	94	91	91	81	81	
Xgwm299	Alēle 1	*	205	*	*	*	*	*	205	*	201	*	205	201	*	205	*	201	201	203	*	
	Alēle 2	*	205	*	*	*	*	*	205	*		*			*		*	201	201	203	*	
Xgwm47*	Alēle 1	*	141	*	*	*	*	*	149	*	164	149	149	151	151	155	*	*	*	145	*	
	Alēle 2	*	151	*	*	*	*	*	149	*	164	149	149	164	166	155	*	*	*	145	*	
Xgwm111	lokuss 1	Alēle 1	126	126	130	130	128	128	130	130	130	128	130	130	126	128	143	143	130	130	126	126
		Alēle 2	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	143	143	130	130	130	130
	lokuss 2	Alēle 1	*	194	174	176	178	*		196	*	178	*	194	178	178	174	174	*	200	188	*
		Alēle 2	*	196	176	176	178	*		196	*	178	*	196	178	178	174	174	*	202	188	*
Xgwm131	lokuss 1	Alēle 1	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113
		Alēle 2	118	118	118	118	118	118	113	113	118	118	113	113	118	118	118	118	118	118	118	118
	lokuss 2	Alēle 1	133	133	*	*	148	148	148	148	148	152	148	148	152	148	150	150	146	146	152	152
		Alēle 2	133	133	*	*	148	148	148	148	148	152	148	148	152	148	150	150	146	146	152	152
Xgwm427	lokuss 1	Alēle 1	*	116	116	*	116	116	116	116	116	116	*	116	*	*	*	*	114	114	*	*
		Alēle 2	*	116	116	*	116	116	116	116	116	116	*	117	*	*	*	*	114	114	*	*
	lokuss 2	Alēle 1	216	*	*	*	221	221	*	219	221	223	219	219	223	*	219	219	219	219	219	219
		Alēle 2	221	*	*	*	221	221	*	219	221	223	219	219	223	*	219	219	219	219	219	219
Xgwm186	lokuss 1	Alēle 1	*	*	132	132	*	*	*	*	132	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		Alēle 2	*	*	132	132	*	*	*	*	132	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	lokuss 2	Alēle 1	164	164	145	145	145	145	140	140	140	164	140	140	164	164	145	145	166	166	140	140
		Alēle 2	164	164	162	162	161	161	140	140	162	164	140	140	164	164	145	145	166	166	140	140
Xgwm148	Alēle 1	*	*	*	*	138	138	*	122	*	138	*	122	127	*	124	*	120	120	128	*	
	Alēle 2	*	*	*	*	138	138	*	122	*	138	*	122	138	*	124	*	120	120	128	*	
Xgwm219	Alēle 1	166	166	147	147	188	188	163	189	178	189	190	190	190	178	189	166	178	178	197	162	
	Alēle 2	195	195	166	147	188	188	190	189	178	189	190	190	190	178	189	189	178	178	197	197	

Marķieris	Šķirne/līnija	31-1331		93-130		Banga		Kozak		Krista		Moda		Sakta		Viesturu		Vinjet		Zentos		
	Indivīds	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Xwgm259	Alēle 1	103	103	101	101	101	101	107	107	101	103	107	107	101	101	103	103	101	101	101	101	
	Alēle 2	103	103	103	103	103	103	107	107	105	107	107	107	101	101	105	105	103	103	105	105	
Xwgm369	Alēle 1	*	*	186	186	186	186	192	186	184	184	186	186	184	184	186	*	210	210	186	186	
	Alēle 2	*	*	186	186	186	186	192	186	184	184	186	186	184	184	186	*	212	212	186	186	
Xwgm437	Alēle 1	135	135	132	132	156	156	135	135	*	139	133	133	135	135	161	161	135	135	131	131	
	Alēle 2	135	135	166	139	156	156	135	135	*	166	135	135	135	135	163	163	135	135	131	131	
Xwgm539	Alēle 1	113	*	115	111	*	115	105	105	*	*	105	105	*	*	105	105	109	109	103	103	
	Alēle 2	118	*	123	111	*	115	105	105	*	*	105	105	*	*	105	105	109	109	103	103	
Xgwm332	lokuss 1	Alēle 1	191	191	191	191	191	191	191	193	191	191	191	191	191	191	191	191	191	191	191	191
		Alēle 2	197	195	195	195	195	195	197	193	195	195	197	197	195	195	197	197	195	195	195	195
	lokuss 2	Alēle 1	*	*	*	*	*	*	219	200	*	*	219	219	*	*	219	219	*	*	*	*
		Alēle 2	*	*	*	*	*	*	219	221	*	*	219	219	*	*	219	219	*	*	*	*
Xwgm260	lokuss 1	Alēle 1	132	*	132	132	132	132	132	*	132		*	132	132	132	132	132	132	132	132	132
		Alēle 2	132	*	132	132	132	132	132	*	132		*	132	132	132	132	132	132	132	132	132
	lokuss 2	Alēle 1	166	*	162	166	166	164	166	*	166	*	*	166	166	166	166	164	*	*	166	166
		Alēle 2	166	*	162	166	166	164	166	*	166	*	*	166	166	166	166	164	*	*	166	166
	lokuss 3	Alēle 1	*	*	*	*	268	*	*	*	*	*	*	268	268	*	268	*	268	268	268	*
		Alēle 2	*	*	*	*	268	*	*	*	*	*	*	268	268	*	268	*	268	268	268	*

* - dotajam paraugam nenovēroja fragmenta amplifikāciju

**Sarkanā āboliņa (*Trifolium*) šķirņu
molekulārās pasportizācijas
metodika**

LLU aģentūra „Zemkopības Zinātniskais institūts”
LU aģentūra „LU Bioloģijas institūts”

2006

Sarkanā āboliņa šķirņu molekulārai pasportizācijai tiek lietota vienkāršo sekvenču atkārtošanas (SSR, simple sequence repeats) marķieru metode.

No katras sarkanā āboliņa šķirnes tiek izdalīta DNS, kura tiek testēta ar 20 šajā metodē lietotajiem praimeriem pāriem PCR (polymerase chain reaction) reakcijā, kuras produktu lokusu alēļu kombinācijas raksturo attiecīgo šķirni.

1. DNS izdalīšana

Paraugu sagatavošana

DNS tika izdalīta no otrās lapas audiem, ko ieguva no trīs nedēļas veciem izdiedzētiem augiem. No katras šķirnes tika atsevišķi ievākti paraugi no 12 indivīdiem. Lapu paraugi tika ievākti 96 paraugu DNS uzglabāšanas platēs un sasaldēti šķidrā slāpekļī. Pēc sasaldēšanas tos ievietoja Luo Lab 3000 saldējošā vakuuma žāvētājā un žāvēja četras diennaktis pie -60°C temperatūras. Izzāvētos paraugus sasmalcināja izmantojot Retsch kratītāju un svina lodītes.

DNS izdalīšanai izmantotais protokols:

Pie katra sasmalcinātā parauga tika pievienots 600 μl CTAB bufera (0.1M Tris, pH8.0; 0.01M EDTA, 0.7M NaCl, 1% CTAB un 1% merkptoetanol) un tad vienu stundu izturēts pie 60°C ūdens vannā. Ekstrakcija tika turpināta pievienojot 600 μl hloroforma-izoamilalkohola, tilpuma attiecībās 24:1, un uzmanīgi samaisot, tad plates tika centrifugētas 20 min. pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas šķidrā fāze no katra parauga tika pārnesta uz jaunu plati, kur tai pievienoja 5 μl Rnāzi (1mg/ml) un inkubēja 30 min pie 37°C . Pēc inkubēšanas pievienoja 0.8 tilpumu auksta izopropanola un uzmanīgi maisīja, tad centrifugēja 10 min pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernantantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā. DNS skaloja ar 76% etanola un 0.2M nātrija acetāta šķīdumu uzmanīgi maisot 20 min istabas temperatūrā un tad centrifugēja 5 min. pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernantantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā. DNS skaloja ar 76% etanola un 0.01M amonija acetāta šķīdumu un centrifugēja 5 min pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernantantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā, izžāvēja paraugu istabas temperatūrā un izšķīdināja plates stobriņa apakšā esošo DNS 50 μl TE buferī (0.01M Tris pH 8.0; 1mM EDTA, pH 8.0).

DNS kvalitātes un kvantitātes noteikšana

Lai pārlicinātos par DNS esamību, kā arī noteiktu vai tās kvalitāte un kvantitāte ir pieņemama lai turpinātu darbu ar mikrosatelītu polimerāzes ķēdes reakcijām (PCR), tika izmantots Eppendorf BioPhotometer (Quantitative analysis).

3. PCR protokoli un produkta sagatavošana analīzei ar sekvenātoru

Tika izvēlēti divdesmit mikrosatelītu praimeru pāri (3. tabula). Pie R praimera sekvensēm tika pievienotas fluorescentās krāsvielas ('ned', 'hex' jeb 'fam').

PCR protokoli

Katra PCR reakcija tika veikta 20 µl tilpumā, kas saturēja 10.5 µl dejonizēta ūdens, 2 µl PCR 10x bufera (Fermentas), 2 µl MgCl₂ (Fermentas), 0.5 µM F praimera, 0.5 µM ar fluorescentu krāsu iezīmētā R priaimera, 0.2 mM katra d’NTP, 0.5 U Taq polimerāzes (Fermentas) and 10-20 ng parauga DNS (1 tilpums). PCR reakcijas apstākļi tika izmantoti kā Kolliker et al. (2005).

Produkta sagatavošana analīzei ar sekvenātoru

No katra PCR produkta 0.5 µl tika ievietots sekvenēšanas plates stobriņā, trīs dažādi PCR produkti vienā (viens, ‘fam’, viens ‘ned’ un viens ‘hex’ tika kombinēti viena plates stobriņā), tam pievienoja 0.4 µl GS350 (rox) garuma standarta, un 10 µl formamīda.

Rezultātu analīze

No analizētajiem marķieriem četriem neizdevās amplificēt produktu: TPSSR23, TPSSR26, TPSSR54 un TPSSR56. Šie marķieri turpmāk netiks apskatīti.

Divi indivīdi no katras šķirnes tika analizēti ar visiem divdesmit marķieriem, bet TPSSR17, TPSSR44, TPSSR13, TPSSR16, TPSSR34, TPSSR50 seši indivīdi no katras šķirnes tika analizēti lai apskatītu daudzveidību vienas šķirnes robežās. Analizētās šķirnes bija ļoti daudzveidīgas šķirnes robežās, piemērs parādīts 1. tabulā.

1. tabula Alēļu frekvences šķirnei ‘Skrīveru tetra’ mikrosatelīta lokusā TPSSR50

Indiv. Nr	Alēles										
	162bp	170bp	174bp	178bp	180bp	186bp	188bp	190bp	194bp	196bp	200bp
1					0.5	0.25	0.25				
2	0.5		0.25				0.25				
3	0.25	0.25				0.25					0.25
4		0.5							0.25		0.25
5				0.25		0.25		0.25	0.25		
6	0.5								0.25	0.25	

Vidēji katram lokusam tika konstatētas 19.5 alēles, t.i no 15 alēlēm līdz 27 alēlēm (2. tabula). Visi lokusi analizētajos paraugos bija polimorfi.

2. tabula. Mikrosatelītu lokusu alēļu skaits un izmēri

Mikrosatelīta lokus	Alēļu skaits	Alēļu izmēri (bp)
<i>TPSSR05</i>	20	177, 181, 188, 190, 192, 195, 197, 199, 200, 202, 204, 205, 207, 210, 212, 214, 218, 223, 225, 227
<i>TPSSR09</i>	20	112, 114, 118, 122, 124, 128, 130, 132, 134, 142, 144, 148, 152, 154, 158, 160, 162, 168, 172, 174
<i>TPSSR10</i>	20	116, 118, 130, 134, 136, 138, 140, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 164, 166, 168, 172, 184
<i>TPSSR13</i>	23	182, 186, 190, 192, 195, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 215, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 231, 233
<i>TPSSR15</i>	15	120, 129, 131, 133, 135, 137, 144, 148, 151, 152, 159, 167, 169, 171, 192
<i>TPSSR16</i>	23	183, 185, 187, 190, 192, 194, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230
<i>TPSSR17</i>	16	142, 144, 148, 150, 154, 148, 150, 154, 156, 158, 160, 164, 166, 172, 176, 186
<i>TPSSR28</i>	15	129, 133, 135, 139, 141, 144, 145, 150, 152, 154, 157, 159, 161, 165, 167
<i>TPSSR29</i>	19	184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 200, 204, 208, 210, 214, 216, 222, 224, 226, 228, 234, 236
<i>TPSSR34</i>	21	170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 206, 210, 216, 218
<i>TPSSR44</i>	16	134, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 160, 164, 166, 168, 170
<i>TPSSR45</i>	27	142, 152, 158, 162, 164, 166, 168, 171, 172, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 206, 210, 214, 223
<i>TPSSR46</i>	18	158, 162, 166, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 188, 194, 196, 200, 211, 213, 215
<i>TPSSR47</i>	18	136, 138, 155, 157, 165, 167, 169, 181, 185, 191, 193, 197, 199, 201, 203, 205, 227, 231
<i>TPSSR50</i>	25	162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 206, 208, 210, 214, 220
<i>TPSSR52</i>	16	103, 105, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 127, 129, 133, 139, 141, 146, 148, 169

No analizētajiem mikrosatelītiem visskaidrāk izšķiramas alēles bija TPSSR09, TPSSR17, TPSSR44, TPSSR13, TPSSR16, TPSSR29, TPSSR34, TPSSR46, TPSSR50 un TPSSR52, šie mikrosatelīti turpmāk var tikt izmantoti šķirņu raksturošanai jeb pasportizācijai.

Atsauces

Kolliker R., Enkerli J. un F.Widmer (2005) 'Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries'. Molecular Ecology notes.

3.tabula Izvēlētie praimeru metodikas atstrādāšanai sarkanam āboliņam

Nr	Nosaukums	sekvence	atkārtojums	p. temp. °C
1	TPSSR05 F	AGG GTG TGC GTG CAA ACA	(GT) ₃₁	55
	TPSSR05 R	TAT GTC TAT CTT CCC TTT TAA TGT CTT CTG		
2	TPSSR09 F	CTT CCA GGT CTT CAA AAT CTCT AAA GG	(GT) ₂₂ GC(GT) ₁₁ (GT) ₁₁	60
	TPSSR09 R	GGG ACC GGA GTT AAG ATA ACT AAC TGT		
3	TPSSR10 F	TGG ACA TCA TGG TTC CCA CG	(CT) ₂₈	65
	TPSSR10 R	TCA AAG AAG CAA GGA ACG GTG		
4	TPSSR13 F	ATCCACAAAACGAATCGCAAG	(TTG) ₁₁ ; (TG) ₁₂	60
	TPSSR13 R	TGCTTCTTCTTCTCCTTTCTCAC		
5	TPSSR15 F	ATC TCA AAG GAC GAC TAG GTA TTT	(CA) ₆ CG(CA) ₅ (CACG) ₅ (CA) ₄ ; (CA) ₁₃	58
	TPSSR15 R	ATT GTT ATC GAT GGA TGA GAG TAA		
6	TPSSR16 F	GCG CTT ATT CGA AGA CGG AA	(CT) ₁₆	58
	TPSSR16 R	TCA GTG GAG TAG GGT CGT CGT		
7	TPSSR17 F	AAGCAGCGAGACTTCCCTTTG	(CTT) ₂₂	60
	TPSSR17 R	TGGAAGGTAAACATCGAGAGCA		
8	TPSSR23 F	CAG TCG GGT TGT TGC CAT TT	(AG) ₃₀	60
	TPSSR23 R	GAG GAA TAA ACT CAA TAC TTC AGT GAC TAG AT		
9	TPSSR26 F	CAA GGG AGA AAG AGA GAA AAG CTC	(CTT) ₅ CC(CT) ₂₁ ; (TC) ₁₆	60
	TPSSR26 R	CCG TAT CAG AAT CGC TGC G		
10	TPSSR28 F	CTC TTA AGG GTT GGT ATT GAA ATC G	(AG) ₁₈	60
	TPSSR28 R	TCT TGT CTC GCC GAC CTT T		
11	TPSSR29 F	TTT CGG TAG TGG AAG ATG ATG GA	(GA) ₃₅	60
	TPSSR29 R	TCA ATA ATT TCA GAA AAA GAT CAA AAC C		
12	TPSSR34 F	GTTAGTGCGC GAAAGGAAGG	(CT) ₇ ; (CT) ₂₂ ; (CT) ₈	60
	TPSSR34 R	GTTCAAGTGGATCAGTGAGTAACACAA		
13	TPSSR44 F	TCTGGCTTTCTTGCCGATATC	(ATTG) ₇ ; (GA) ₂₀ ; (GA) ₆	60
	TPSSR44 R	ACACCCTGTTTCGTGAAGCAC		
14	TPSSR45 F	TGT GTT ATG GTG AAG TTC AAA ATA TAA TTT C	(GA) ₂₇ ; (GA) ₅	60
	TPSSR45 R	CCA ATG GCG TCA ATG GTC TC		
15	TPSSR46 F	TCA AAT AAA ACT TTC ATA ACG TTC ATC TC	(TC) ₂₈	60
	TPSSR46 R	TCC GAA GAA ACC ATT ATC TAC GTT G		
16	TPSSR47 F	TTG CGA GAA ACA GAA GGAA CAC	(GGT) ₄ (AG) ₂₉	60
	TPSSR47 R	CAT TCC CTC TGT TTA AAA TTG AAA CAA		
17	TPSSR50 F	AAGGCCCATGTTGAAACTGC	(CT) ₂₃	60
	TPSSR50 R	TTTGTTTCAGGAAAATGAGGCG		
18	TPSSR52 F	ATT CCT TCC ATC TTC TCT ATG T	(CT) ₃₁	60
	TPSSR52 R	TTA TAT TAA TGG GAG TTA GTA TGA TCT A		
19	TPSSR54 F	TGG TGT GTA TGA GTG AAA AAA CTG G	(AG) ₂₉	55
	TPSSR54 R	TCC CTT ACC TCA CTC ACC ACA TC		
20	TPSSR56 F	AAT AAA ACC TAC ATT AGG AGC TGC TTT T	(AG) ₇ AT(AG) ₁₅ G(GA) ₆	60
	TPSSR56 R	CCG CCG GAA TCC GG		

**Kartupeļu (*Solanum tuberosum*) šķirņu
molekulārās pasportizācijas
metodika**

Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūts
Molekulārās pasportizācijas laboratorija,
VMZI „SILAVA”

Kartupeļu šķirņu molekulārai pasportizācijai tiek lietota vienkāršo sekvenču atkārtotāšanas (SSR, simple sequence repeats) marķieru metode.

No katras kartupeļu šķirnes tiek izdalīta DNS, kura tiek testēta ar 10 šajā metodē lietotajiem praimeriem pāriem PCR (polymerase chain reaction) reakcijā, kuras produktu lokusu alēļu kombinācijas raksturo attiecīgo šķirni.

DNS izdalīšana

Materiāli:

- Izejmateriāls – apmēram 0,2 g attiecīgās kartupeļu šķirnes juvenīlā daļa (asni, jauno lapu augošā daļa);
- TE (Tris-EDTA) 10 mM buferis, pH 8,0;
- β-merkaptotetanolis, 99%, p.a.;
- Genomic DNA Purification Kit #K0512 („Fermentas”, Lietuva);
- Etilspirts, 96 %;
- 70 % etilspirta ūdens šķīdums;
- Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem);
- Hloroforms, HPLS.

DNS izdalīšanas protokols:

1. Pie TE bufera īsi pirms izdalīšanas pievieno β-merkaptotetanolu attiecībā 1 : 0,004.
2. Ievieto piestiņā apm. 0,2 g izejmateriāla, pievieno 200 μl pagatavoto 1.p.šķīdumu un 400 μl lizējošo (lysis) šķīdumu.
3. Sasmalcina līdz viendabīgai masai un pārvieto 1,5 ml Eppendorfa stobriņā, kuru inkubē pie 65°C 5 minūtes.
4. Pievieno 600 μl hloroforma, sakrata un centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes.
5. Sagatavo izgulsnēšanas šķīdumu : sajauc 720 μl ūdeni ar 80 μl izgulsnēšanas (precipitation) šķīdumu.
6. Pēc centrifugēšanas 4.p. atdala virsējo ūdens slāni, kurš satur DNS un pārnēs to citā Eppendorfa stobriņā. Pievieno 800 μl pagatavoto izgulsnēšanas šķīdumu. Maisa istabas temperatūrā 1-2 minūtes. Centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes.
7. Pilnībā atdala virspusē esošo šķīduma slāni. Nogulsnes izšķīdina 100 μl 1,2 M NaCl šķīdumā. Tām jābūt pilnīgi izšķīdušām.
8. Pievieno 4 μl ribonukleāzes šķīdumu (0,1 mg/ ml) un iztur pie temperatūras 37-40°C apm. 0,5 stundu.
9. Pievieno 300 μl atdzesēta līdz - 20°C 96% etilspirta un iztur 20 minūtes pie - 20°C. Centrifugē pie 10 000 apgr. min. 5 minūtes.
10. Atdala etilspirtu un mazgā ar 1 ml atdzesētu līdz - 20°C 70 % etilspirta ūdens šķīdumu. Jāpānāk, lai DNS nogulsnes tiktu pilnībā suspendētas šķīdumā (brīvi peldētu). Centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes. Atdala šķīdro fāzi un nogulsnes žāvē pie istabas temperatūras apm. 1 stundu.
11. Iegūto DNS preparātu izšķīdina 100 μl ūdens. Glabā pie – 20°C temperatūras.

DNS preparāta koncentrācijas noteikšana un kvalitātes pārbaude

DNS preparāta koncentrāciju nosaka spektrofotometriski, izmērot absorbciju pie 260 nm. 1 optiskā blīvuma vienība atbilst 50 mkg /ml DNS.

DNS tīrību pārbauda, izmērot optisko absorbciju pie 280 nm.

Optisko absorbciju attiecībai 260nm/280 nm jābūt lielākai par 1,8, kas liecina par to, ka preparāts nesatur fenolu un olbaltumvielu piemaisījumus.

DNS kvalitātes pārbaudi var veikt arī elektroforētiski, salīdzinot preparātu ar raksturojošiem garuma marķieriem.

PCR reakcija

Materiāli:

- DNS parauga šķīdums (c= 40-60ng/μl);
- 10 X Taq buferis ar KCl – MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 25 mM MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 10 mM dNTP Mix („Fermentas”, Lietuva);
- Taq DNA Polymerase (recombinant) 5 U/μl („Fermentas”, Lietuva);
- Marķēšanas praimeru pāri:
 - tiešais praimeris F (forward),
 - reversais praimeris R (reverse),
- 10 nM („Applied Biosystems”, ASV):

STM1021F	5' GGAGTCAAAGTTTGCTCACATC	6-FAM
STM1021R	5' CACCCTCAACCCCATATC	
STM0037F	5' AATTAACTTAGAAGATTAGTCTC	NED
STM0037R	5' ATTTGGTTGGGTATGATA	
STM2020F	5' CCTTCCCCTTAAATACAATAACCC	HEX
STM2020R	5' CATGGAGAAGTGAAAACGTCTG	
LemalxF	5' CTCACCCACAAAGAAAATTC	NED
LemalxR	5' CTAACAAACATTGTACAACAATAATC	
STM1049F	5' CTACCAGTTTGTGATTGTGGTG	6-FAM
STM1049R	5' AGGGACTTTAATTTGTTGGACG	
STM1004F	5' ATATGAAATTCTCTCGATGTTTCG	HEX
STM1004R	5' TCAGCCCATAAAXCTTTAGTTACCT	
STM0007F	5' GGACAAGCTGTGAAGTTTAT	6-FAM
STM0007R	5' AATTGAGAAAGAGTGTGTGTG	
STM3016F	5' TCAGAACACCGAATGGAAAAC	HEX
STM3016R	5' GCTCCAACCTTACTGGTCAAATCC	

Katra marķēšanas praimera pāra tiešais praimeris F iezīmēts ar vienu no fluorescējošām krāsvielām:

- 6-FAM (zila),
- HEX (zaļa),
- NED (dzeltena),

kas dod iespēju genotipēšanas procesā apvienot PCR reakciju produktus.

Visi materiāli tiek glabāti pie temp – 20°C un atkausēti nelielos daudzumos neilgi pirms izmantošanas.

Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem).

Praimeru glabāšanas šķīdumu pagatavošana

Pie 10 nM praimera pievieno 50 µl TE buferi. Rūpīgi maisa līdz pilnīgai izšķīšanai. Uzglabā tumsā – 20°C temperatūrā.

4 µM praimeru darba šķīdumu pagatavošana

Pie 2 µl praimera glabāšanas šķīduma pievieno 98 µl TE buferi. Darba šķīdumu pagatavo neilgi pirms tā izmantošanas.

PCR reakcijas protokols

1. Vienā PCR plātes bedrītē ievieto 20- 50 ng analizējamā DNS parauga;
2. Pagatavo sagataves šķīdumu:
 - 10 X Taq buferis ar KCl – MgCl₂,
 - MgCl₂ 2,5 mM,
 - dNTPs Mix 0,2 mM,
 - F praimeris 0,2 µM,
 - R praimeris 0,2 µM,
 - Taq DNA Polymerase (recombinant) 0,5 U,
 - H₂O līdz 24 µl (ņemot vērā 1.p.).
3. Pievieno sagataves šķīdumu DNS paraugam.
4. PCR reakcijas apstākļi:
 - Denaturācija 95°C 3 min.
 - 35 cikli:
 - denaturācija 95°C, 20 sekundes,
 - pielipšana (annealing) 50°C, 20 sekundes,
 - elungācija 72°C, 20 sekundes.
 - Beigu elongācija 72°C, 10 min.

Fragmentu analīze (genotipēšana)

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

Materiāli

- Polimērs 3100 POP-4 TM („ABI”)
- Hi-Di TM Formamide („ABI”)
- GeneScan TM -350 ROX TM Size Standard („ABI”)
- Buffer (10 X) ar EDTA („ABI”)
- 4 kanālu kapilārs 36 cm

Paraugu sagatavošana genotipēšanai

Apvieno pa 0,5 µl katru PCR iegūtos fragmentus ar atšķirīgām krāsvielu iezīmēm (6-FAM, HEX, NED), pievieno 0,4 µl GeneScan TM -350 ROX TM Size Standart un 10 µl Hi-Di TM formamīda. Denaturē termociklera aparātā pie 95°C 5 minūtes. Strauji atdzesē līdz 0°C.

Sagaidāmie alēļu lielumi (bp):

Praimeris	Sagaidāmā fragmenta apgabals (bp)
STM1021	160-190
STM0037	60 – 90
STM2020	140 -160
Lemalx	120 – 130
STM1049	170 – 190
STM1004	140 – 270
STM0007	170 – 220
STM3016	95 - 115

Kartupeļu molekulārās – ģenētiskās pasportizācijas metodes izstrādes rezultāti

Atrastie alēļu lielumi (bp):

Šķirne	Praimeri							
	STM1021	STM003	STM2020	Lemalx	STM1049	STM1004	STM007	STM3016
Agra	161/175/ 187	68/73/75	146/158	122/125	173/186	151/255	188/209/ 213	102/104/ 110
Eksports	161/187	68/73/75	146/158	119/122/ 125	186	151/254	188/209/ 213	102/104/ 110
Gauja	185/187/ 189/191	68/73/75	140/146/ 153	122/125	184	160/234/ 253	187/209	108
Izstādes	185/187	68/73/75/ 81	146/158	119/122	186	254/261	188/213	104/108
Laimdota	171/175/ 185	70/75	143/146/ 153	122/125	186	151/160/ 233/254	188/209/ 213	104/110
Lauma	165/171/ 175	70/75	141/158	122	184/186	160/233	188/209/ 213	102/110
Māris	68/73/81	143/146/ 153	122	184/186	151/254/ 260	188/209/ 213	102/108/ 110	
Monta	145/164/ 172/192	68/73/75	143/153/ 158	119/122	177/184	159/233/ 254/260	194	102/108/ 110
Sarmiņa	171/185/ 187/191	73/81/83	143/146/ 153	122/128	186	151/160/ 233/251	209	102/108
Zīle	171/175/ 187	68/73/83	143/153	122/128	177/186	151/234/ 255	186/192/ 209	102

**Ābeļu (*Malus sp.*) šķirņu
molekulārās pasportizācijas
metodika**

Valsts aģentūra „Latvijas Valsts Augļkopības institūts”

2006

Ābeļu šķirņu molekulārai pasportizācijai tiek lietota vienkāršo sekvenču atkārtšanas (SSR, Simple Sequence Repeats) marķieru metode.

No katras ābeļu šķirnes tiek izdalīta DNS, kura tiek testēta ar 10 šajā metodē lietotajiem praimeriem pāriem PCR (Polymerase Chain Reaction) reakcijā, kuras produktu lokusu alēļu kombinācijas raksturo attiecīgo šķirni.

DNS izdalīšana

Materiāli:

- Izejmateriāls – apmēram 0,2 g attiecīgās saldo ķiršu šķirnes juvenīlā daļa (asni, jauno lapu augošā daļa);
- TE (Tris-EDTA) 10 mM buferis, pH 8,0;
- β-merkaptotetanolis, 99%, p.a.;
- Genomic DNA Purification Kit #K0512 („Fermentas”, Lietuva);
- Etilspirts, 96 %;
- 70 % etilspirta ūdens šķīdums;
- Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem);
- Hloroforms, HPLS.

DNS izdalīšanas protokols:

12. Pie TE bufera īsi pirms izdalīšanas pievieno β-merkaptotetanolu attiecībā 1 : 0,004.
13. Ievieto piestiņā apm. 0,2 g izejmateriāla, pievieno 200 μl pagatavoto 1.p.šķīdumu un 400 μl lizējošo (lysis) šķīdumu.
14. Sasmalcina līdz viendabīgai masai un pārvieta 1,5 ml Eppendorfa stobriņā, kuru inkubē pie 65°C 5 minūtes.
15. Pievieno 600 μl hloroforma, sakrata un centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes.
16. Sagatavo izgulsnēšanas šķīdumu : sajauc 720 μl ūdeni ar 80 μl izgulsnēšanas (precipitation) šķīdumu.
17. Pēc centrifugēšanas 4.p. atdala virsējo ūdens slāni, kurš satur DNS un pārnes to citā Eppendorfa stobriņā. Pievieno 800 μl pagatavoto izgulsnēšanas šķīdumu. Maisa istabas temperatūrā 1-2 minūtes. Centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes.
18. Pilnībā atdala virspusē esošo šķīduma slāni. Nogulsnes izšķīdina 100 μl 1,2 M NaCl šķīdumā. Tām jābūt pilnīgi izšķīdušām.
19. Pievieno 4 μl ribonukleāzes šķīdumu (0,1 mg/ ml) un iztur pie temperatūras 37-40°C apm. 0,5 stundu.
20. Pievieno 300 μl atdzesēta līdz - 20°C 96% etilspirta un iztur 20 minūtes pie - 20°C. Centrifugē pie 10 000 apgr. min. 5 minūtes.
21. Atdala etilspirtu un mazgā ar 1 ml atdzesētu līdz - 20°C 70 % etilspirta ūdens šķīdumu. Jāpānāk, lai DNS nogulsnes tiktu pilnībā suspendētas šķīdumā (brīvi peldētu). Centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes. Atdala šķīdro fāzi un nogulsnes žāvē pie istabas temperatūras apm. 1 stundu.
22. Iegūto DNS preparātu izšķīdina 100 μl ūdens. Glabā pie – 20°C temperatūras.

DNS preparāta koncentrācijas noteikšana un kvalitātes pārbaude

DNS kvalitātes pārbaude veikta elektroforētiski, salīdzinot preparātu ar raksturojošiem masas marķieriem (50 ng/μl) - Mass Ruler DNA Ladder Low Range #SM0383 (Fermentas, Lietuva). Kvalitātes pārbaude veikta 2% agara gelā TAE buferšķīdumā.

PCR reakcija

Materiali:

- DNS parauga šķīdums (c= 40-60ng/μl);
- 10 X Taq buferis ar KCl („Fermentas”, Lietuva);
- 25 mM MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 10 mM dNTP Mix („Fermentas”, Lietuva);
- Taq DNA Polymerase (recombinant) 5 U/μl („Fermentas”, Lietuva);
- Marķēšanas praimeru pāri:
 - tiešais praimeris F (forward),
 - reversais praimeris R (reverse),
- 10 nM („Applied Biosystems”, ASV):

1	CH 01E12F	5' AAA CTG AAG CCA TGA GGG C	NED
	CH 01E12R	5' TTC CAA TTC ACA TGA GGC TG	
2	CH 01F02F	5' ACC ACA TTA GAG CAG TTG AGG	NED
	CH 01F02R	5' CTG GTT TGT TTT CCT CCA GC	
3	CH 01H01F	5' GAA AGA CTT GCA GTG GGA GC	HEX
	CH 01H01R	5' GGA GTG GGT TTG AGA AGG TT	
4	CH 01H10F	5' TGC AAA GAT AGG TAG ATA TAT GCC A	HEX
	CH 01H10R	5' AGG AGG GAT TGT TTG TGC AC	
5	CH 02C06F	5' TGA CGA AAT CCA CTA CTA ATG CA	NED
	CH 02C06R	5' GAT TGC GCG CTT TTT AAC AT	
6	CH 02D12F	5' AAC CAG ATT TGC TTG CCA TC	6-FAM
	CH 02D12R	5' GCT GGT GGT AAA CGT GGT G	
7	CH 01B12F	5' CGC ATG CTG ACA TGT TGA AT	HEX
	CH 01B12R	5' CGG TGA GCC CTC TTA TGT GA	
8	COLF	5' AGG AGA AAG GCG TTT ACC TG	NED
	COLR	5' GAC TCA TTC TTC GTC GTC ACT	
9	Vf A	5' TGA AAG AGA GAT CCA GAA AGT G	
	Vf B	5' CAT CCC TCC ACA AAT GCC	
10	Vf C	5' CGT AGA ACG GAA TTT GAC AGT G	
	Vf D	5' GAC AAA GGG CTT AAG TGC TCC	

Katra marķēšanas praimera pāra tiešais praimeris F iezīmēts ar vienu no fluorescējošām krāsvielām:

- 6-FAM (zila),
- HEX (zaļa),
- NED (dzeltena),

kas dod iespēju genotipēšanas procesā apvienot PCR reakciju produktus.

Visi materiāli tiek glabāti pie temp – 20°C un atkausēti nelielos daudzumos neilgi pirms izmantošanas.

Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem).

Praimeru glabāšanas šķīdumu pagatavošana

Pie 10 nM praimera pievieno 50 µl TE buferi. Rūpīgi maisa līdz pilnīgai izšķīšanai. Uzglabā tumsā – 20°C temperatūrā.

4 µM praimeru darba šķīdumu pagatavošana

Pie 2 µl praimera glabāšanas šķīduma pievieno 98 µl TE buferi. Darba šķīdumu pagatavo neilgi pirms tā izmantošanas.

PCR reakcijas protokoli:

1) Praimeriem Nr. 1. – 8. (Gianfranceschi et al., 1998)

5. Vienā PCR plates bedrītē ievieto 20- 50 ng analizējamā DNS parauga;
6. Pagatavo sagataves šķīdumu:
 - 1 X Taq buferis ar KCl – MgCl₂,
 - MgCl₂ 1,5 mM,
 - dNTPs Mix 0,2 mM (katrs dNTP),
 - F praimeris 0,2 µM,
 - R praimeris 0,2 µM,
 - Taq DNA Polymerase (recombinant) 1 U,
 - H₂O līdz 24 µl (ņemot vērā 1.p.).
7. Pievieno sagataves šķīdumu 1 µl DNS paraugam.
8. PCR reakcijas apstākļi:
 - Denaturācija 94°C 2 min. 30 s.
 - 4 cikli:
 - denaturācija 94°C, 30 sekundes,
 - pielipšana (annealing) 65°C, 60 sekundes, ar katru ciklu pielipšanas temperatūru samazinot pa 1°C,
 - elongācija 72°C, 60 sekundes.
 - 30 cikli:
 - denaturācija 94°C, 30 sekundes,
 - pielipšana (annealing) 60°C, 60 sekundes,
 - elongācija 72°C, 60 sekundes.
 - Beigu elongācija 72°C, 10 min.

2) Praimeriem Nr. 9. – 10. (Vejl et al., 2003)

1. Vienā PCR plates bedrītē ievieto 25 ng analizējamā DNS parauga;
2. Pagatavo sagataves šķīdumu:
 - 1 X Taq buferis ar KCl,
 - MgCl₂ 1,5 mM,
 - dNTPs Mix 0,2 mM (katrs dNTP),
 - A praimeris 0,2 µM,

- B praimeris 0,2 μ M,
 - C praimeris 0,1 μ M,
 - D praimeris 0,1 μ M,
 - Taq DNA Polymerase (recombinant) 0,8 U,
 - H₂O līdz 24 μ l (ņemot vērā 1.p.).
3. Pievieno sagataves šķīdumu 1 μ l DNS paraugam.
4. PCR reakcijas apstākļi:
- Denaturācija 94°C 2 min.
 - 1 cikls:
 - denaturācija 94°C, 150 sekundes,
 - pielipšana (annealing) 60°C, 60 sekundes,
 - elongācija 72°C, 120 sekundes.
 - 35 cikli:
 - denaturācija 94°C, 30 sekundes,
 - pielipšana (annealing) 60°C, 60 sekundes,
 - elongācija 72°C, 120 sekundes.
 - Beigu elongācija 72°C, 10 min.

Fragmentu analīze (genotipēšana) – praimeriem 1. – 8.

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

Materiāli

- Polimērs 3100 POP-4 TM („ABI”)
- Hi-Di TM Formamide („ABI”)
- GeneScan TM -350 ROX TM Size Standard („ABI”)
- Buffer (10 X) ar EDTA („ABI”)
- 4 kanālu kapilārs 36 cm

Paraugu sagatavošana genotipēšanai

Apvieno pa 0,5 μ l katru PCR iegūtos fragmentus ar atšķirīgām krāsvielu iezīmēm (6-FAM, HEX, NED), pievieno 0,4 μ l GeneScan TM -350 ROX TM Size Standart un 10 μ l Hi-Di TM formamīda. Denaturē termociklera aparātā pie 95°C 5 minūtes. Strauji atdzesē līdz 0°C.

Paredzami alēļu lielumi (bp)

Praimeris	Sagaidāmā fragmenta apgabals (bp)
CH 01E12	243 – 248
CH 01F02	168 – 222
CH 01H01	107 – 141
CH 01H10	93 – 119
CH 02C06	216 – 254
CH 02D12	175 – 205
CH 01B12	123 – 130
COL	213 – 239

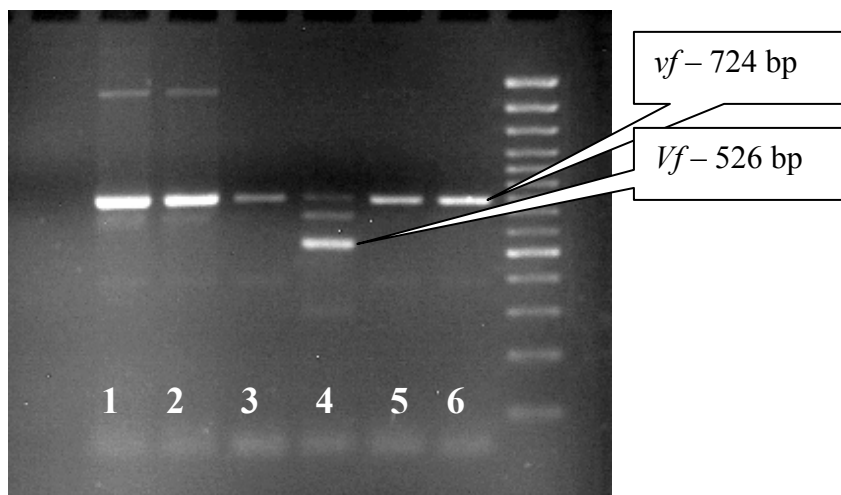
Fragmentu analīze (genotipēšana) – praimeriem 9. – 10.

Agarozes gēla elektroforēze: fragmentu analīze veikta 2% agara gelā TAE buferšķīdumā, DNS fragmentus iekrāsojot ar 10% etīdija bromīda šķīdumu (ethidium bromide) un vizualizējot ar ultravioleto gaismu (1.attēls).

Paredzami alēļu garumi (bp):

Vf – 526 bp – dominantā alēle, kas nosaka rezistences pret kraupi esamību;

vf – 724 bp – recesīvā alēle, rezistences pret kraupi nav.



1. attēls. Kraupja rezistenci noteicošās *Vf* gēna alēles noteikšana

- 1 – Wjčik (*Co*)
- 2 – Mc Intosh
- 3 – Sīpoliņš
- 4 – Prima (*Vf*) – rezistenā kontroles šķirne
- 5 – Baltais Dzidrais
- 6 – *M. silvestris*

Atsauces

Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M., Gessler C., 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet*, 96: 1069 – 1076.

Vejl P., Skupinova S., Blažek J., Sedlák P., Bardová M., Drahošova H., Blažkova H., Milec Z. 2003. PCR markers of apples resistance to scab (*Venturia inaequalis* CKE.) controlled by Vf gene in Czech apple breeding. *Plant Soil Environ*, 49 (9): 427 – 432.

**Sīpolu (*Allium cepa* L.) klonu
molekulārās pasportizācijas
metodika**

SIA Pūres dārzkopības pētījumu centrs
Molekulārās pasportizācijas laboratorija,
VMZI „SILAVA”

2006

Sīpolu klonu molekulārai pasportizācijai tiek lietota vienkāršo sekvenču atkārtšanas (SSR, Simple Sequence Repeat) marķieru metode.

No katra sīpolu genotipa tiek izdalīta DNS, kura tiek testēta ar 15 šajā metodē lietotajiem praimeru pāriem PCR (Polymerase Chain Reaction) reakcijā, kuras produktu lokusu alēļu kombinācijas raksturo attiecīgo šķirni.

DNS izdalīšana

Materiāli

- DNS Izejmateriāls – apm. 2 g attiecīgā sīpolu genotipa asna audi;
- TE (Tris-EDTA) 10 mM buferis, pH 8,0;
- β-merkaptoetanolis, 99%, p.a;
- DNS izdalīšanas komplekts (Genomic DNA Purification Kit K0512 („Fermentas”, Lietuva));
- Etilspirts, 96 %;
- 70 % etilspirta ūdens šķīdums;
- Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem);
- Hloroforms : izoamil spirts (24:1);
- Ribonukleāze.

DNS izdalīšanas protokols

23. Pie TE bufera īsi pirms izdalīšanas pievieno β-merkaptoetanolu attiecībā 1 : 0,004.
24. Ievieto piestiņā apm. 0,2 g izejmateriāla, pievieno 200 μl pagatavoto 1.p.šķīdumu un 400 μl lizējošo (lysis) šķīdumu.
25. Sasmalcina līdz viendabīgai masai un pārvieto 1,5 ml Eppendorfa stobriņā, kuru inkubē pie 65°C 5 minūtes.
26. Pievieno 600 μl hloroforma, sakrata un centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes.
27. Sagatavo izgulsnēšanas šķīdumu : sajauc 720 μl ūdeni ar 80 μl izgulsnēšanas (precipitation) šķīdumu.
28. Pēc centrifugēšanas 4.p. atdala virsējo ūdens slāni, kurš satur DNS un pārnes to citā Eppendorfa stobriņā. Pievieno 800 μl pagatavoto izgulsnēšanas šķīdumu. Maisa istabas temperatūrā 1-2 minūtes. Centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes.
29. Pilnībā atdala virspusē esošo šķidruma slāni. Nogulsnes izšķīdina 100 μl 1,2 M NaCl šķīdumā. Tām jābūt pilnīgi izšķīdušām.
30. Pievieno 4 μl ribonukleāzes šķīdumu (0,1 mg/ ml) un iztur pie temperatūras 37-40°C apm. 0,5 stundu.
31. Pievieno 300 μl atdzesēta līdz - 20°C 96% etilspirta un iztur 20 minūtes pie - 20°C. Centrifugē pie 10 000 apgr. min. 5 minūtes.
32. Atdala etilspirtu un mazgā ar 1 ml atdzesētu līdz - 20°C 70 % etilspirta ūdens šķīdumu. Jāpānāk, lai DNS nogulsnes tiktu pilnībā suspendētas šķīdumā (brīvi peldētu). Centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes. Atdala šķidro fāzi un nogulsnes žāvē pie istabas temperatūras apm. 1 stundu.
33. Iegūto DNS preparātu izšķīdina 100 μl ūdens. Glabā pie – 20°C temperatūras.

DNS preparāta koncentrācijas noteikšana un kvalitātes pārbaude

DNS preparāta koncentrāciju nosaka spektrofotometriski, izmērot absorbciju pie 260 nm. 1 optiskā blīvuma vienība atbilst 50 mkg/ml

DNS.

DNS tīrību pārbauda, izmērot optisko absorbciju pie 280 nm.

Optisko absorbciju attiecībai 260nm/280 nm jābūt lielākai par 1,8, kas liecina par to, ka preparāts nesatur fenolu un olbaltumvielu piemaisījumus.

DNS kvalitātes pārbaudi var veikt arī elektroforētiski, salīdzinot preparātu ar raksturojošiem garuma marķieriem.

PCR reakcija

Materiāli

- DNS parauga šķīdums (c= 40-60ng/μl);
- 10 X Taq buferis ar KCl – MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 25 mM MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 10 mM dNTP Mix („Fermentas”, Lietuva);
- Taq DNA Polymerase (recombinant) 5 U/μl („Fermentas”, Lietuva);
- Marķēšanas praimeru pāri:
 - tiešais praimeris F (forward),
 - reversais praimeris R (reverse),
- 10 nM („Applied Biosystems”, ASV):

AMS04F	5' TATGTTTTTCAGCTGCGATGTGAG
AMS04R	5' AAATCTAAGCACGGATACCAAGTG
AMS06F	5' GGTGCATAGGGTCTCATCTG
AMS06R	5' ATTGATTGTTTGTGGATGTG
AMS07F	5' TGCGAATGTGAGGTTTTCTGC
AMS07R	5' CGACCCGGAAATTCGATC
AMS08F	5' GCCACGATGTTGAGATTTTCG
AMS08R	5' CCCGAATATCCCACCAGTTC
AMS10F	5' TTCATGTTGTATTGAGATTTGG
AMS10R	5' GAAGGAATGGAAGCAGTTC
AMS12F	5' AATGTTGCTTTCTTTAGATGTTG
AMS12R	5' TGCAAAATTACAAGCAAACCTG
AMS13F	5' ACCTTTTAAATTGACGATATTCC
AMS13R	5' CTGCACTATTCTGTGATGTATTTC
AMS14F	5' CCCCTGAGTAAATTCAAATCC
AMS14R	5' TCCTTAGTATAATTCGGGGTAAC
AMS16F	5' CTGCATTAACAACCAAACCTG
AMS16R	5' GAGCTCCACTTCTTCCAAACTAG
AMS22F	5' CACCGTTCCATAATCAAGG
AMS22R	5' ATTTTTTGGGCATTGTTGG
AMS23F	5' GCTGTTCACTGGTCTATCTGG
AMS23R	5' ATTCGGTGCTGATTTTCG
AMS25F	5' GAGGGCAGTGTTAGCATTC
AMS25R	5' GCAACCTTTCCCCGAGAG
AMS26F	5' ATCTAATCAAAGCATAGTTG
AMS26R	5' TTGTCCAAGTAGTTGTGA

AMS29F	5' CATCAGAAAATCGCATCAC
AMS29R	5' TTGAAACTTGGAAGGTTGTC
AMS30F	5' CACTAATGGGGTAAATAATGTTCTAC
AMS30R	5' TTGCCTTGAAATCCAGAC

Katra marķēšanas praimera pāra tiešais praimeris F iezīmēts ar vienu no fluorescējošām krāsvielām:

- 6-FAM (zila),
- HEX (zaļa),
- NED (dzeltena),

kas dod iespēju genotipēšanas procesā apvienot PCR reakciju produktus.

Visi materiāli tiek glabāti pie temp – 20°C un atkausēti nelielos daudzumos neilgi pirms izmantošanas.

Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem).

Praimeru glabāšanas šķīdumu pagatavošana

Pie 10 nM praimera pievieno 50 µl TE buferi. Rūpīgi maisa līdz pilnīgai izšķīšanai. Uzglabā tumsā – 20°C temperatūrā.

4 µM praimeru darba šķīdumu pagatavošana

Pie 2 µl praimera glabāšanas šķīduma pievieno 98 µl TE buferi. Darba šķīdumu pagatavo neilgi pirms tā izmantošanas.

PCR reakcijas protokols

9. Vienā PCR stobriņā ievieto 20 - 50 ng analizējamā DNS parauga

10. Pagatavo PCR sagataves šķīdumu:

- 10 x Taq buferis ar KCl – MgCl₂,
- MgCl₂ 2,5 mM,
- dNTP_{mix} 0,2 mM,
- F praimeris 0,2 µM,
- R praimeris 0,2 µM,
- Taq DNA Polymerase (recombinant) 0,5 vien.,
- H₂O līdz 25 µl (ņemot vērā l.p.).

11. Pievieno sagataves šķīdumu DNS paraugam.

12. PCR reakcijas apstākļi:

- Denaturācija 94°C 2 min.
- 3 cikli:
 - Denaturācija 94 °C, 5 sekundes,
 - Pielipšana (annealing) 53, °C 45 sekundes,
 - Elongācija 72 °C, 60 sekundes.
- 35 cikli:
 - Denaturācija 94°C, 15 sekundes,
 - pielipšana (annealing) 55°C, 10 sekundes, (59 °C praimeriem AMS 22 un AMS 23),
 - elongācija 72°C, 80 sekundes,
- Beigu elongācija 72°C, 5 min.

Fragmentu analīze (genotipēšana)

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

Materiāli

- Polimērs 3100 POP-4 TM („ABI”)
- Hi-Di TM Formamide („ABI”)
- GeneScan TM -350 ROX TM Size Standard („ABI”)
- Buffer (10 X) ar EDTA („ABI”)
- 4 kanālu kapilārs 36 cm

Paraugu sagatavošana genotipēšanai

Apvieno pa 0,5 µl katru PCR iegūtos fragmentus ar atšķirīgām krāsvielu iezīmēm (6-FAM, HEX, NED), pievieno 0,4 µl GeneScan TM -350 ROX TM Size Standart un 10 µl Hi-Di TM formamīda. Denaturē termociklera aparātā pie 95°C 5 minūtes. Strauji atdzesē līdz 0°C.

**Meloņu (*Cucumis melo* L.) šķirņu
molekulārās pasportizācijas
metodika**

SIA Pūres dārzkopības pētījumu centrs
Molekulārās pasportizācijas laboratorija,
VMZI „SILAVA”

2006

Meloņu klonu molekulārai pasportizācijai tiek lietota vienkāršo sekvenču atkārtotāšanas (SSR, Simple Sequence Repeat) marķieru metode.

No katra meloņu genotipa tiek izdalīta DNS, kura tiek testēta ar 15 šajā metodē lietotajiem praimeru pāriem PCR (Polymerase Chain Reaction) reakcijā, kuras produktu lokusu alēļu kombinācijas raksturo attiecīgo šķirni.

DNS izdalīšana

Materiāli:

- Izejmateriāls – apmēram 0,2 g attiecīgās kartupeļu šķirnes juvenīlā daļa (asni, jauno lapu augošā daļa);
- TE (Tris-EDTA) 10 mM buferis, pH 8,0;
- β-merkaptotetanolis, 99%, p.a.;
- Genomic DNA Purification Kit #K0512 („Fermentas”, Lietuva);
- Etilspirts, 96 %;
- 70 % etilspirta ūdens šķīdums;
- Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem);
- Hloroforms, HPLS.

DNS izdalīšanas protokols:

34. Pie TE bufera īsi pirms izdalīšanas pievieno β-merkaptotetanolu attiecībā 1 : 0,004.
35. Ievieto piestiņā apm. 0,2 g izejmateriāla, pievieno 200 μl pagatavoto 1.p.šķīdumu un 400 μl lizējošo (lysis) šķīdumu.
36. Sasmalcina līdz viendabīgai masai un pārvieta 1,5 ml Eppendorfa stobriņā, kuru inkubē pie 65°C 5 minūtes.
37. Pievieno 600 μl hloroforma, sakrata un centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes.
38. Sagatavo izgulsnēšanas šķīdumu : sajauc 720 μl ūdeni ar 80 μl izgulsnēšanas (precipitation) šķīdumu.
39. Pēc centrifugēšanas 4.p. atdala virsējo ūdens slāni, kurš satur DNS un pārnes to citā Eppendorfa stobriņā. Pievieno 800 μl pagatavoto izgulsnēšanas šķīdumu. Maisa istabas temperatūrā 1-2 minūtes. Centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes.
40. Pilnībā atdala virspusē esošo šķīduma slāni. Nogulsnes izšķīdina 100 μl 1,2 M NaCl šķīdumā. Tām jābūt pilnīgi izšķīdušām.
41. Pievieno 4 μl ribonukleāzes šķīdumu (0,1 mg/ ml) un iztur pie temperatūras 37-40°C apm. 0,5 stundu.
42. Pievieno 300 μl atdzesēta līdz - 20°C 96% etilspirta un iztur 20 minūtes pie - 20°C. Centrifugē pie 10 000 apgr. min. 5 minūtes.
43. Atdala etilspirtu un mazgā ar 1 ml atdzesētu līdz - 20°C 70 % etilspirta ūdens šķīdumu. Jāpānāk, lai DNS nogulsnes tiktu pilnībā suspendētas šķīdumā (brīvi peldētu). Centrifugē pie 10 000 apgr.min. 5 minūtes. Atdala šķīdro fāzi un nogulsnes žāvē pie istabas temperatūras apm. 1 stundu.
44. Iegūto DNS preparātu izšķīdina 100 μl ūdens. Glabā pie – 20°C temperatūras.

DNS preparāta koncentrācijas noteikšana un kvalitātes pārbaude

DNS preparāta koncentrāciju nosaka spektrofotometriski, izmērot absorbciju pie 260 nm. 1 optiskā blīvuma vienība atbilst 50 mkg /ml DNS.

DNS tīrību pārbauda, izmērot optisko absorbciju pie 280 nm.

Optisko absorbciju attiecībai 260nm/280 nm jābūt lielākai par 1,8, kas liecina par to, ka preparāts nesatur fenolu un olbaltumvielu piemaisījumus.

DNS kvalitātes pārbaudi var veikt arī elektroforētiski, salīdzinot preparātu ar raksturojošiem garuma marķieriem.

PCR reakcija

Materiāli:

- DNS parauga šķīdums (c= 40-60ng/μl);
- 10 X Taq buferis ar KCl – MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 25 mM MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 10 mM dNTP Mix („Fermentas”, Lietuva);
- Taq DNA Polymerase (recombinant) 5 U/μl („Fermentas”, Lietuva);
- Marķēšanas praimeru pāri:
 - tiešais praimeris F (forward),
 - reversais praimeris R (reverse),
- 10 nM („Applied Biosystems”, ASV):

CMCTT144F	5' CAAAAGGTTTCGATTGGTGGG
CMCTT144R	5' AAATGGTGGGGGTTGAATAGG
CMACC146F	5' CAACCACCGACTACTAAGTC
CMACC146R	5' CGACCAAACCCATCCGATAA
CMGA104F	5' TTA CTGGGTTTTG CCGATTT
CMGA104R	5' AATTC CGTATTCAACTCTCC
CMAT141F	5' AAGCACACCACCACCCGTAA
CMAT141R	5' GTGAATGGTATGTTATCCTTG
CMCCA145F	5' GAGGGAAGGCAGAAACCAAAG
CMCCA145R	5' GCTACTTTTGTGGTGGTGG
CMTC13F	5' TGGATGGATAAGGTGGTAAG
CMTC13R	5' TTCCCCTAGTCGCTCTCT
CMGT108F	5' CTCCTTCAAACATTGTGTGTG
CMGT108R	5' GAGATAGGTATAGTATAGGGG
CMCT134bF	5' GCTCCTCCTTAACTCTATAC
CMCT134bR	5' GCATTATTACCCATGTACGAG
CMCT44F	5' TCAACTGTCCATTTCTCGCTG
CMCT44R	5' CCGTAAAGACGAAAACCTTC
CMTC168F	5' ATCATTGGATGTGGGATTCTC
CMTC168R	5' ACAGATGGATGAAACCTTAGG
CMCT170bF	5' ATTGCCCAACTAACTAAACC
CMCT170bR	5' CACAACACAATATCATCCTTG
CMAG59F	5' TTGGGTGGCAATGAGGAA
CMAG59R	5' ATATGATCTTCCATTCCA
CMTC47F	5' GCATAAAAGAATTTGCAGAC

CMTC47R	5' AGAATTGAGAAGAGATAGAG
CMGA15F	5' CGGCAAGACGATTGGCAGC
CMGA15R	5' ATCACCGTAGCGAAGCACC
CMTA170aF	5' TTAAATCCCAAAGACATGGCG
CMTA170aR	5' AGACGAAGGACGGTTAGCTTT

Katra marķēšanas praimera pāra tiešais praimeris F iezīmēts ar vienu no fluorescējošām krāsvielām:

- 6-FAM (zila),
- HEX (zaļa),
- NED (dzeltena),

kas dod iespēju genotipēšanas procesā apvienot PCR reakciju produktus.

Visi materiāli tiek glabāti pie temp – 20°C un atkausēti nelielos daudzumos neilgi pirms izmantošanas.

Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem).

Praimeru glabāšanas šķīdumu pagatavošana

Pie 10 nM praimera pievieno 50 µl TE buferi. Rūpīgi maisa līdz pilnīgai izšķīšanai. Uzglabā tumsā – 20°C temperatūrā.

4 µM praimeru darba šķīdumu pagatavošana

Pie 2 µl praimera glabāšanas šķīduma pievieno 98 µl TE buferi. Darba šķīdumu pagatavo neilgi pirms tā izmantošanas.

PCR reakcijas protokols

13. Vienā PCR stobriņā ievieto 20 - 50 ng analizējamā DNS parauga.
14. Pagatavo PCR sagataves šķīdumu
 - 10 x Taq buferis ar KCl – MgCl₂,
 - MgCl₂ 2,5 mM,
 - dNTP_{mix} 0,2 mM,
 - F praimeris 0,2 µM,
 - R praimeris 0,2 µM,
 - Taq DNA Polymerase (recombinant) 0,5 vien.,
 - H₂O līdz 25 µl (ņemot vērā 1.p.).
15. Pievieno sagataves šķīdumu DNS paraugam.
16. PCR reakcijas apstākļi:
 - Denaturācija 94°C 2 min.
 - 35 cikli:
 - Denaturācija 94°C, 45 sekundes,
 - pielipšana (annealing) 51°C, 45 sekundes,
 - (53 °C praimeriem CMAT 141, CMAT 145, CMAT 170a),
 - elongācija 72°C, 45 sekundes.
 - Beigu elongācija 72°C, 5 min.

Fragmentu analīze (genotipēšana)

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

Materiāli

- Polimērs 3100 POP-4 TM („ABI”)
- Hi-Di TM Formamide („ABI”)
- GeneScan TM -350 ROX TM Size Standard („ABI”)
- Buffer (10 X) ar EDTA („ABI”)
- 4 kanālu kapilārs 36 cm

Paraugu sagatavošana genotipēšanai

Apvieno pa 0,5 µl katru PCR iegūtos fragmentus ar atšķirīgām krāsvielu iezīmēm (6-FAM, HEX, NED), pievieno 0,4 µl GeneScan TM -350 ROX TM Size Standart un 10 µl Hi-Di TM formamīda. Denaturē termociklera aparātā pie 95°C 5 minūtes. Strauji atdzesē līdz 0°C.

**Miežu (*Hordeum*) šķirņu
molekulārās pasportizācijas
metodika**

Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūts
LU aģentūra „LU Bioloģijas institūts”

2006

Miežu šķirņu molekulārai pasportizācijai tiek lietota vienkāršo sekvenču atkārtšanas (SSR, simple sequence repeats) marķieru metode.

No katras miežu šķirnes tiek izdalīta DNS, kura tiek testēta ar 10 šajā metodē lietotajiem praimeriem pāriem PCR (polymerase chain reaction) reakcijā, kuras produktu lokusu alēļu kombinācijas raksturo attiecīgo šķirni.

1. DNS izdalīšana

Paraugu sagatavošana

DNS tika izdalīta no otrās jeb trešās lapas audiem, ko ieguva no divu nedēļu veciem izdiedzētiem augiem. No katras šķirnes tika atsevišķi ievākti paraugi no 8 indivīdiem. Lapu paraugi tika ievākti 96 paraugu DNS uzglabāšanas platēs un sasaldēti šķidrā slāpekļī. Pēc sasaldēšanas tos ievietoja Luo Lab 3000 saldējošā vakuuma žāvētājā un žāvēja četras diennaktis pie -60°C temperatūras. Izžāvētos paraugus sasmalcināja izmantojot Retsch kratītāju un svina lodītes.

DNS izdalīšanai izmantotais protokols:

Pie katra sasmalcinātā parauga tika pievienots 600 μl CTAB buffera (0.1M Tris, pH 8.0; 0.01M EDTA, 0.7M NaCl, 1% CTAB un 1% merkaptotanolis) un tad vienu stundu izturēts pie 60°C ūdens vannā. Ekstrakcija tika turpināta pievienojot 600 μl hloroforma-izoamilalkohola, tilpuma attiecībās 24:1, un uzmanīgi samaisot, tad plates tika centrifugētas 20 min. pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas šķidrā fāzē no katra parauga tika pārnesta uz jaunu plati, kur tai pievienoja 5 μl Rnāzi (1mg/ml) un inkubēja 30 min pie 37°C . Pēc inkubēšanas pievienoja 0.8 tilpumu auksta izopropanola un uzmanīgi maisīja, tad centrifugēja 10 min pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernatantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā. DNS skaloja ar 76% etanola un 0.2M nātrija acetāta šķīdumu uzmanīgi maisot 20 min istabas temperatūrā un tad centrifugēja 5 min. pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernatantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā. DNS skaloja ar 76% etanola un 0.01M amonija acetāta šķīdumu un centrifugēja 5 min pie 13 200 apg/min. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi nolēja supernatantu lai saglabātu DNS plates stobriņa apakšā, izžāvēja paraugu istabas temperatūrā un izšķīdināja plates stobriņa apakšā esošo DNS 50 μl TE bufferī (0.01M Tris pH 8.0; 1mM EDTA, pH 8.0).

DNS kvalitātes un kvantitātes noteikšana

Lai pārlicinātos par DNS esamību, kā arī noteiktu vai tās kvalitāte un kvantitāte ir pieņemama lai turpinātu darbu ar mirosatelītu polimerāzes ķēdes reakcijām (PCR), tika izmantots Eppendorf BioPhotometer (Quantitative analysis).

3. PCR protokoli un mikrosatelītu praimeru sekvences

Mikrosatelītu praimeru

Pasportizācijai tika izvēlēti desmit mikrosatelītu praimeru pāri (1. tabula), kurus atlasīja savā pētījumā Macaulay et al (2001). To sekvences tika publicētas jau 2000 gadā (Ramsay et al., 2000) un pieejamas internetā <http://www.genetics.org/cgi/content/full/156/4/1997/DC1>.

1. tabula. Miežu mikrosatelītu praimeru, to sekvences un izmantotais PCR protokols

Nr	Nosaukums	sekvence	atkārtojums	PQR protokols
1	<i>Bmac0032</i> F	CCA TCA AAG TCC GGC TAG	(AC) ₇ T(CA) ₁₅ (AT) ₉	1
	<i>Bmac0032</i> R	GTC GGG CCT CAT ACT GAC		
2	<i>Bmac0040</i> F	AGC CCG ATC AGA TTT ACG	(AC) ₂₀	2
	<i>Bmac0040</i> R	TTC TCC CTT TGG TCC TTG		
3	<i>Bmac0067</i> F	AAC GTA CGA GCT CTT TTT CTA	(AC) ₁₈	3
	<i>Bmac0067</i> R	ATG CCA ACT GCT TGT TTA G		
4	<i>Bmac0399</i> F	CGA TGC TTT ACT ATG AGA GGT	(AC) ₂₁	1
	<i>Bmac0399</i> R	GGG TCT GAA GCC TGA AG		
5	<i>Bmag0013</i> F	AAG GGG AAT CAA AAT GGG AG	(CT) ₂₁	2
	<i>Bmag0013</i> R	TCG AAT AGG TCT CCG AAG AAA		
6	<i>Bmag0125</i> F	AAT TAG CGA GAA CAA AAT CAC	(AG) ₁₉	3
	<i>Bmag0125</i> R	AGA TAA CGA TGC ACC ACC		
7	<i>Bmag0135</i> F	ACG AAA GAG TTA CAA CGG ATA	(AG) ₁₀ GG(AG) ₁₂	2
	<i>Bmag0135</i> R	GTT TAC CAC AGA TCT ACA GGT G		
8	<i>Bmag0173</i> F	CAT TTT TGT TGG TGA CGG	(CT) ₂₉	2
	<i>Bmag0173</i> R	ATA ATG GCG GGA GAG ACA		
9	<i>EBmac0701</i> F	ATG ATG AGA ACT CTT CAC CC	n/a	1
	<i>EBmac0701</i> R	TGG CAC TAA AGC AAA AGA C		
10	<i>HvM67</i> F	GTC GGG CTC CAT TGC TCT	(GA) ₁₁	4
	<i>HvM67</i> R	CCG GTA CCC AGT GAC GAC		

Pie R praimera sekvencēm tika pievienotas fluorescentās krāsvielas: 'hex' pie *Bmac0032* R, *Bmag0173* R un *HvM67* R; 'fam' pie *Bmac0040* R, *Bmac0067* R, *EBmac0701* R un *Bmac0399* R; un 'ned' pie *Bmag0013* R, *Bmag0125* R un *Bmag0135* R.

PCR protokoli

Katra PCR reakcija tika veikta 20 µl tilpumā, kas saturēja 10.5 µl dejonizēta ūdens, 2 µl PCR 10x bufera (Fermentas), 2 µl MgCl₂ (Fermentas), 0.5 µM F praimera, 0.5 µM ar florescentu krāsu iezīmētā R praimera, 0.2 mM katra d'NTP, 0.5 U Taq polimerāzes (Fermentas) and 10-20 ng parauga DNS (1 µl tilpums). PCR reakcijas apstākļi tiks izmantoti saskaņā ar četriem SCRI protokoliem (1. un 2. tabula).

2. tabula. PCR apstākļu protokoli

Protokols 1	
1 cikls:	3 min 94 °C 1 min 66 °C 1 min 72 °C
5 cikli:	30 s 94 °C 30 s 65 °C (pazemina temperatūru par 1°C/cikls) 30 s 72 °C
20 cikli:	30 s 94 °C 30 s 60 °C 30 s 72 °C
Noslēgumā	5 min 72 °C

Protokols 2	
1 cikls:	3 min 94 °C 1 min 58 °C 1 min 72 °C
25 cikli:	30 s 94 °C 30 s 58 °C 30 s 72 °C
Noslēgumā	5 min 72 °C

Protokols 3	
1 cikls:	3 min 94 °C 1 min 55 °C 1 min 72 °C
25 cikli:	1 min 94 °C 1 min 55 °C 1 min 72 °C
Noslēgumā	5 min 72 °C

Protokols 4	
1 cikls:	3 min 94 °C
10 cikli:	1 min 94 °C 1 min 64 °C (pazemina temperatūru par 1°C/cikls) 1 min 72 °C
20 cikli:	1 min 94 °C 1 min 55 °C 1 min 72 °C
Noslēgumā	5 min 72 °C

3. PCR produktu analīze

PCR produkta sagatavošana

No katra PCR produkta ņem vienu µl un ievieto sekvenēšanas 96 paraugu plates stobriņā. Katrā plates stobriņā tiek ievietoti PCR produkti no trim markieriem, kam ir atšķirīgas florescentās krāsa, t.i. 'fam'+ 'ned'+ 'hex'. Katrā plates stobriņā tapat tiek pievienots 0.1 µl garuma standarta un 8.9 µl formamīda.

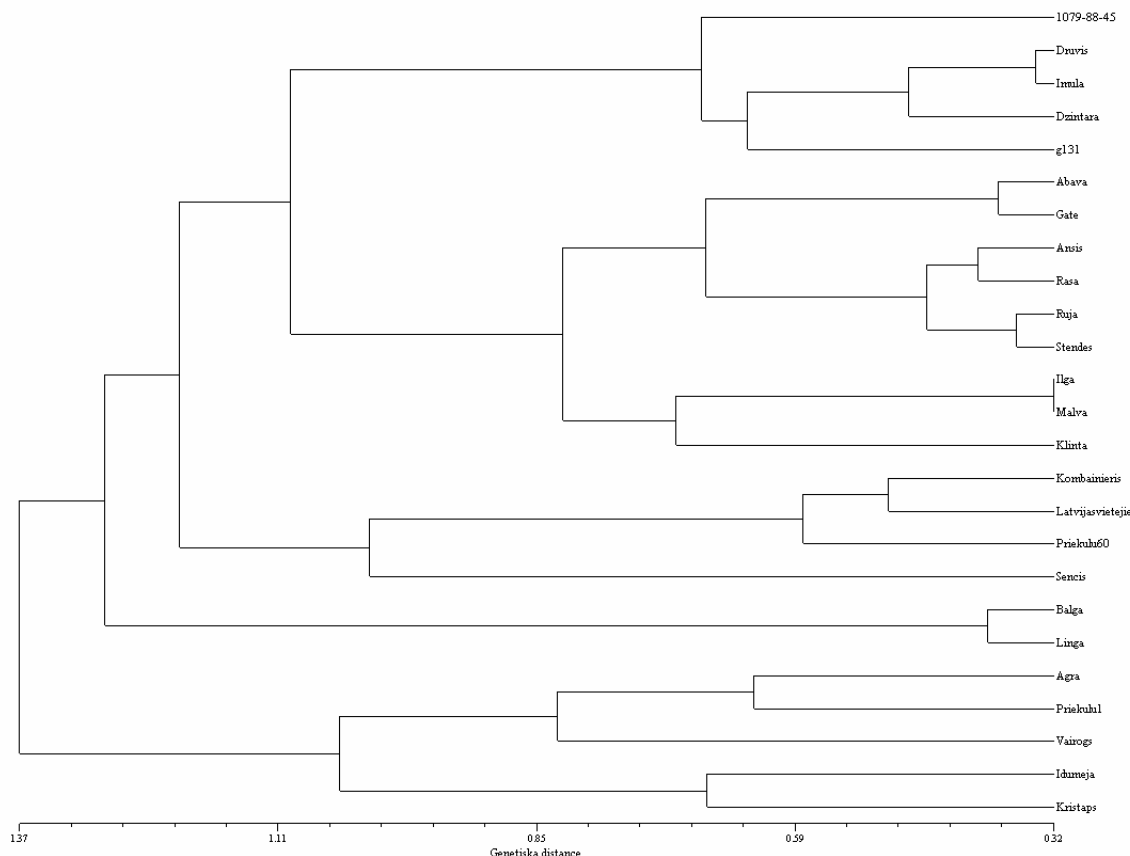
Resultātu analīze

No katras šķirnes tika analizēti divi indivīdi. Alleļu sastāvs katram indivīdam pie katra lokusa parādīts pielikuma tabulā (1p. tabula). Vidēji katram lokusam tika konstatētas 6.6 alleles, t.i. no 4 allelēm līdz 11 allelēm (3. tabula).

3. tabula. Mikrosatelītu lokusu alleļu skaits un izmēri

Mikrosatelīta lokus	Hromosoma	Alēļu skaits	Alleļu izmēri (bp)
<i>Bmac0032</i>	1H	11	210, 213, 215, 217, 219, 221, 226, 229, 231, 241 un 243
<i>Bmac0040</i>	6H	9	198, 203, 207, 221, 226, 231, 233, 235, un 237
<i>Bmac0067</i>	3H	7	151, 169, 171, 172, 175, 177 un 179
<i>Bmac0399</i>	1H	7	122, 134, 136, 144, 147, 150 un 152
<i>Bmag0013</i>	3H	5	151, 155, 157, 159 un 163
<i>Bmag0125</i>	2H	5	129, 131, 133, 135 un 139
<i>Bmag0135</i>	7H	5	141, 143, 145, 156 un 158
<i>Bmag0173</i>	6H	7	112, 114, 126, 130, 145, 147 un 156
<i>EBmac0701</i>	4H	6	137, 141, 143, 145, 148 un 150
<i>HvM67</i>	4H	4	108, 112, 114 un 141

Balstoties uz iegūtajiem datiem tika izveidota dendrograma (1. attēls). Tajā redzams, ka izmantoto mikrosatelītu informācija ir pietiekama, lai atšķirtu gandrīz visas šķirnes un līnijas.



1. attēls. Denrograma kas parāda šķirņu un līniju radniecību balstoties uz mikrosatelītu datiem, genētiskās distānces aprēķinātas pēc Nei (1978).

Ja apskata alēļu vienveidību, katram marķierim vienas šķirnes jeb līnijas robežās (8. pielikums), tad jāsecina, ka nav tādas šķirnes jeb līnijas, kurai tā būtu atrodama visiem marķierim, līdz ar to lai veidotu pasportizāciju, analizēs būtu noteikti jāiekļauj vairāk indivīdu no vienas šķirnes jeb līnijas.

Atsauces

- Macaulay M., Ramsay L., Powell W. un W. Waugh (2001). 'A representative, highly informative' genotyping set' of barley SSRs', *Theoretical and Applied Genetics* 102, 801-809.
- Nei M. (1978). 'Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals'. *Genetics* 89, 583-590.
- Ramsay L., Macaulay M., Ivanissevich S.D., MacLean K., Cardle L., Fuller J., Edwards K.J., Tuvešson S., Morgante M., Massari A., Maestri E., Marmiroli N., Sjakste T., Ganal M., Powell W. un R. Waugh (2000). 'A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156, 1997-2005.

8. pielikums

Miežu šķirņu / līniju alēļu sastāvs analizētajos lokusos

Paraugi			Mikrosatelītu alēles																			
			HVM 67		Bmac0032		Bmac0040		Bmac0173		Bmac0399		EBmac0701		Bmag0013		Bmag0067		Bmag0125		Bmag0135	
Nr	Šķirne / līnija	Indivīds	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2
1	1079-88-45	1	114	114	229	231	221	221	147	147	144	144	150	150	157	157	177	177	131	131	141	141
		2	114	114	229	231	221	221	147	147	144	144	150	150	157	157	179	179	131	131	141	141
2	Abava	1	114	114	213	213	198	198	130	130	144	144	145	145	159	159	177	177	133	133	141	141
		2	114	114	217	217	203	203	130	130	122	122	145	145	157	157	171	171	139	139	141	141
3	Agra	1	112	112	217	217	*	*	130	130	122	122	150	150	157	157	171	171	139	139	*	*
		2	112	112	213	213	203	203	156	156	144	144	150	150	159	159	177	177	139	139	*	*
4	Ansis	1	114	114	213	213	235	235	156	156	144	144	145	145	157	157	177	177	135	135	143	143
		2	114	114	213	213	235	235	156	156	144	144	145	145	159	159	177	177	135	135	143	143
5	Balga	1	108	108	213	213	237	237	156	156	134	134	137	137	159	159	177	177	135	135	143	143
		2	108	108	213	213	237	237	130	130	147	147	137	137	157	157	177	177	129	129	143	143
6	Druvis	1	112	112	241	243	198	198	112	130	136	136	150	150	157	157	169	169	133	133	141	141
		2	112	112	217	217	198	198	147	147	144	144	150	150	159	159	177	177	133	133	141	141
7	Dzintara	1	112	112	217	217	226	226	147	147	144	144	150	150	159	159	177	177	133	133	*	*
		2	112	112	217	217	221	221	126	126	144	144	150	150	157	157	177	177	135	135	*	*
8	g131	1	114	114	213	213	198	198	147	147	144	144	150	150	159	159	177	177	133	133	143	143
		2	114	114	217	217	198	198	147	147	144	144	150	150	159	159	177	177	133	133	143	143
9	Gate	1	114	114	217	217	231	231	126	126	144	144	145	145	157	157	177	177	135	135	141	141
		2	114	114	213	213	231	231	130	130	150	152	145	145	155	155	151	151	129	129	141	141
10	Idumeja	1	112	112	213	213	235	235	130	130	150	152	150	150	155	155	151	151	129	129	141	141
		2	112	112	210	210	235	235	130	130	147	147	150	150	157	157	177	177	129	129	141	141
11	Ilga	1	108	108	210	210	235	235	130	130	147	147	137	137	157	157	177	177	129	129	143	143
		2	114	114	219	219	235	235	147	147	136	136	145	145	157	157	177	177	133	133	143	143
12	Imula	1	112	112	219	219	237	237	147	147	136	136	150	150	157	157	177	177	133	133	141	141
		2	112	112	217	217	235	235	147	147	122	122	150	150	157	157	175	175	131	131	141	141
13	Klinta	1	114	114	213	213	235	235	145	145	147	147	148	148	157	157	177	177	135	135	*	*
		2	114	114	213	213	237	237	*	*	147	147	145	145	157	157	177	177	133	133	158	158
14	Kombainieris	1	141	141	217	217	233	233	147	147	136	136	141	141	157	157	177	177	131	131	156	156
		2	114	114	219	219	233	233	130	130	122	122	137	137	159	159	177	177	133	133	143	143
15	Kristaps	1	114	114	*	*	*	*	130	130	*	*	150	150	*	*	177	177	129	129	143	143
		2	114	114	*	*	*	*	130	130	*	*	150	150	*	*	177	177	129	129	143	143
16	Latvijas vietējie	1	114	114	219	219	221	221	130	130	122	122	141	141	159	159	177	177	133	133	156	156
		2	114	114	226	226	221	221	*	*	144	144	141	141	159	159	177	177	133	133	156	156

17	Linga	1	*	*	213	213	233	233	145	145	134	134	*	*	159	159	177	177	135	135	*	*
		2	108	108	213	213	233	233	130	130	144	144	137	137	159	159	177	177	133	133	*	*
18	Malva	1	*	*	217	217	235	235	156	156	136	136	143	143	157	157	177	177	133	133	143	143
		2	114	114	219	219	235	235	147	147	136	136	148	148	157	157	179	179	135	135	143	143
19	Priekuļul	1	112	112	221	221	221	235	130	130	*	*	148	148	159	159	177	177	139	139	*	*
		2	112	112	221	221	221	221	130	130	144	144	148	148	159	159	177	177	139	139	*	*
20	Priekuļu60	1	114	114	219	219	207	207	147	147	122	122	148	148	159	159	177	177	133	133	145	145
		2	114	114	219	219	207	207	130	130	122	122	148	148	*	*	177	177	133	133	145	145
21	Rasa	1	114	114	217	217	235	235	114	126	144	144	141	145	157	157	177	177	135	135	158	158
		2	114	114	217	217	235	235	114	126	144	144	145	145	157	157	177	177	135	135	158	158
22	Rūja	1	114	114	217	217	*	*	126	126	144	144	145	145	155	157	177	177	135	135	143	143
		2	114	114	217	217	221	221	147	147	144	144	145	145	155	155	177	177	135	135	143	143
23	Sencis	1	114	114	215	215	233	233	130	130	147	147	150	150	151	151	172	172	133	133	145	145
		2	114	114	215	215	233	233	130	130	147	147	148	148	151	151	172	172	133	133	143	143
24	Stendes	1	114	114	217	217	231	231	145	145	144	144	145	145	159	159	177	177	135	135	143	143
		2	114	114	217	217	231	231	145	145	144	144	148	148	159	159	177	177	135	135	143	143
25	Vairogs	1	112	112	217	217	235	235	130	130	134	134	150	150	163	163	179	179	139	139	*	*
		2	112	112	219	219	235	235	130	130	134	134	150	150	163	163	179	179	139	139	*	*

(* - paraugam neamplificējas PQR produkts)

**Saldo ķiršu (*Prunus avium* L.) šķirņu
molekulārās pasportizācijas
metodika**

Valsts aģentūra „Latvijas Valsts Augļkopības institūts”

2006

Saldo ķiršu šķirņu molekulārai pasportizācijai tiek lietota vienkāršo sekvenču atkārtotāšanas (SSR, Simple Sequence Repeats) marķieru metode.

No katras saldo ķiršu šķirnes tiek izdalīta DNS, kura tiek testēta ar 10 šajā metodē lietotajiem praimeriem pāriem PCR (Polymerase Chain Reaction) reakcijā, kuras produktu lokusu alēļu kombinācijas raksturo attiecīgo šķirni.

DNS izdalīšana

Materiāli:

- Izejmateriāls – apmēram 0,2 g attiecīgās saldo ķiršu šķirnes juvenīlā daļa (asni, jauno lapu augošā daļa);
- TE (Tris-EDTA) 10 mM buferis, pH 8,0;
- β-merkaptotetanolis, 99%, p.a.;
- Genomic DNA Purification Kit #K0512 („Fermentas”, Lietuva);
- Etilspirts, 96 %;
- 70 % etilspirta ūdens šķīdums;
- Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem);
- Hloroforms, HPLS.

DNS izdalīšanas protokols:

45. Pie TE bufera īsi pirms izdalīšanas pievieno β-merkaptotetanolu attiecībā 1 : 0,004.
46. Ievieto piestiņā apm. 0,2 g izejmateriāla, pievieno 200 μl pagatavoto 1.p.šķīdumu un 400 μl lizējošo (lysis) šķīdumu.
47. Sasmalcina līdz viendabīgai masai un pārvieta 1,5 ml Eppendorfa stobriņā, kuru inkubē pie 65°C 5 minūtes.
48. Pievieno 600 μl hloroforma, sakrata un centrifugē pie 10 000 apgr./min. 5 minūtes.
49. Sagatavo izgulsnēšanas šķīdumu : sajauc 720 μl ūdeni ar 80 μl izgulsnēšanas (precipitation) šķīdumu.
50. Pēc centrifugēšanas 4.p. atdala virsējo ūdens slāni, kurš satur DNS un pārnes to citā Eppendorfa stobriņā. Pievieno 800 μl pagatavoto izgulsnēšanas šķīdumu. Maisa istabas temperatūrā 1-2 minūtes. Centrifugē pie 10 000 apgr./min. 5 minūtes.
51. Pilnībā atdala virspusē esošo šķīduma slāni. Nogulsnes izšķīdina 100 μl 1,2 M NaCl šķīdumā. Tām jābūt pilnīgi izšķīdušām.
52. Pievieno 4 μl ribonukleāzes šķīdumu (0,1 mg/ ml) un iztur pie temperatūras 37-40°C apm. 0,5 stundu.
53. Pievieno 300 μl atdzesēta līdz - 20°C 96% etilspirta un iztur 20 minūtes pie - 20°C. Centrifugē pie 10 000 apgr. min. 5 minūtes.
54. Atdala etilspirtu un mazgā ar 1 ml atdzesētu līdz - 20°C 70 % etilspirta ūdens šķīdumu. Jāpānāk, lai DNS nogulsnes tiktu pilnībā suspendētas šķīdumā (brīvi peldētu). Centrifugē pie 10 000 apgr./min. 5 minūtes. Atdala šķīdro fāzi un nogulsnes žāvē pie istabas temperatūras apm. 1 stundu.
55. Iegūto DNS preparātu izšķīdina 100 μl ūdens. Glabā pie – 20°C temperatūras.

DNS preparāta koncentrācijas noteikšana un kvalitātes pārbaude

DNS kvalitātes pārbaude veikta elektroforētiski, salīdzinot preparātu ar raksturojošiem masas marķieriem (50 ng/μl) - Mass Ruler DNA Ladder Low Range #SM0383 (Fermentas, Lietuva). Kvalitātes pārbaude veikta 2% agarā gelā TAE buferšķīdumā.

PCR reakcija

Materiali:

- DNS parauga šķīdums (c= 40-60ng/μl);
- 1 X Taq buferis ar KCl – MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 25 mM MgCl₂ („Fermentas”, Lietuva);
- 10 mM dNTP Mix („Fermentas”, Lietuva);
- Taq DNA Polymerase (recombinant) 5 U/μl („Fermentas”, Lietuva);
- Marķēšanas praimeru pāri:
 - tiešais praimeris F (forward),
 - reversais praimeris R (reverse),
- 10 nM („Applied Biosystems”, ASV):

1	PS12A02F	5' GCC ACC AAT GGT TCT TCC	6-FAM
	PS12A02R	5' AGC ACC AGA TGC ACC TGA	
2	PMS49F	5' TCA CGA GCA AAA GTG TCT CTG	HEX
	PMS49R	5' CAC TAA CAT CTC TCC CCT CCC	
3	PMS3F	5' TGG ACT TCA CTC ATT TCA GAG A	NED
	PMS3R	5' ACT GCA GAG AAT TTC ACA ACC A	
4	PMS40F	5' TCA CTT TCG TCC ATT TTC CC	HEX
	PMS40R	5' TCA TTT TGG TCT TTG AGC TCG	
5	PMS67F	5' AGT CGC TCA CAG TCA GTT TCT	NED
	PMS67R	5' TTA ACT TAA CCC CTC TCC CTC C	
6	PMS2F	5' CAC TGT CTC CCA GGT TAA ACT	6-FAM
	PMS2R	5' CCT GAG CTT TTG ACA CAT GC	
7	PceGA59F	5' AGA ACC AAA AGA ACG CTA AAA TC	NED
	PceGA59R	5' CCT AAA ATG AAC CCC TCT ACA AAT	
8	PS08E08F	5' CCC AAT GAA CAA CTG CAT	6-FAM
	PS08E08R	5' CAT ATC AAT CAC TGG GAT G	
9	UDP97-402F	5' TCC CAT AAC CAA AAA AAA CAC C	6-FAM
	UDP97-402R	5' TGG AGA AGG GTG GGT ACT TG	
10	UDP96-005F	5' GTA ACG CTC GCT ACC ACA AA	HEX
	UDP96-005R	5' CCT GCA TAT CAC CAC CCA G	

Praimeri izvēlēti, balstoties uz publicētām metodikām (Cantini et al., 2001; Downey & Iezzoni, 2000; Wunsch & Hormaza, 2004). Atlases kritēriji:

- augsts polimorfisms iepriekšējos izmēģinājumos;
- maksimāli iespējams genoma pārklājums;
- atšķirīgi sagaidāmie produkta garumi.

Katra marķēšanas praamera pāra tiešais praimeris F iezīmēts ar vienu no fluorescējošām krāsvielām:

- 6-FAM (zila),
- HEX (zaļa),
- NED (dzeltena),

kas dod iespēju genotipēšanas procesā apvienot PCR reakciju produktus.

Visi materiāli tiek glabāti pie temp – 20°C un atkausēti nelielos daudzumos neilgi pirms izmantošanas.

Ūdens molekulārai bioloģijai (demineralizēts, attīrīts no nukleāzēm un proteīnu piemaisījumiem).

Praimeru glabāšanas šķīdumu pagatavošana

Pie 10 nM praimera pievieno 50 µl TE buferi. Rūpīgi maisa līdz pilnīgai izšķīšanai. Uzglabā tumsā – 20°C temperatūrā.

4 µM praimeru darba šķīdumu pagatavošana

Pie 2 µl praimera glabāšanas šķīduma pievieno 98 µl TE buferi. Darba šķīdumu pagatavo neilgi pirms tā izmantošanas.

PCR reakcijas protokoli:

1) Praimeriem Nr. 1. – 8. (Cantini et al., 2001; Downey & Iezzoni, 2000)

17. Vienā PCR plates bedrītē ievieto ~ 50 ng analizējamā DNS parauga;

18. Pagatavo sagataves šķīdumu:

- 10 X Taq buferis ar KCl,
- MgCl₂ 2,5 mM,
- dNTPs Mix 0,2 mM (katrs dNTP),
- F praimeris 2,5 pM,
- R praimeris 2,5 pM,
- Taq DNA Polymerase (recombinant) 0,6 U,
- H₂O līdz 24 µl (ņemot vērā 1.p.).

19. Pievieno sagataves šķīdumu 1 µl DNS paraugam.

20. PCR reakcijas apstākļi:

- Denaturācija 94°C 5 min.,
- 30 cikli:
 - denaturācija 94°C, 1 min.,
 - pielipšana (annealing) 55°C, 1 min.,
 - elongācija 72°C, 1 min.
- Beigu elongācija 72°C, 5 min.

2) Praimeriem Nr. 9. – 10. (Wunsch & Hormaza, 2004)

1. Vienā PCR plates bedrītē ievieto 20- 50 ng analizējamā DNS parauga;

2. Pagatavo sagataves šķīdumu:

- 10 X Taq buferis ar KCl,
- MgCl₂ 4 mM,
- dNTPs Mix 0,1 mM (katrs dNTP),
- F praimeris 0,2 µM,
- R praimeris 0,2 µM,

- Taq DNA Polymerase (recombinant) 0,45 U,
 - H₂O līdz 24 µl (ņemot vērā 1.p.).
3. Pievieno sagataves šķīdumu 1 µl DNS paraugam.
4. PCR reakcijas apstākļi:
- Denaturācija 94°C 2 min.
 - 35 cikli:
 - denaturācija 94°C, 45 sekundes,
 - pielipšana (annealing) 57°C, 45 sekundes,
 - elongācija 72°C, 1 minūte.
 - Beigu elongācija 72°C, 5 min.

Fragmentu analīze (genotipēšana)

PCR reakcijā iegūtie DNS fragmenti tiek analizēti uz DNS sekvenatora Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer ABI izmantojot GeneMapper programmu.

Materiāli

- Polimērs 3100 POP-4 TM („ABI”)
- Hi-Di TM Formamide („ABI”)
- GeneScan TM -350 ROX TM Size Standard („ABI”)
- Buffer (10 X) ar EDTA („ABI”)
- 4 kanālu kapilārs 36 cm

Paraugu sagatavošana genotipēšanai

Apvieno pa 0,5 µl katru PCR iegūtos fragmentus ar atšķirīgām krāsvielu iezīmēm (6-FAM, HEX, NED), pievieno 0,4 µl GeneScan TM -350 ROX TM Size Standard un 10 µl Hi-Di TM formamīda. Denaturē termociklera aparātā pie 95°C 5 minūtes. Strauji atdzesē līdz 0°C.

Paredzamie alēļu lielumi (bp)

Praimeris	Sagaidāmā fragmenta apgabals (bp)
PS12A02	150 – 178
PMS49	79 – 185
PMS3	152 – 200
PMS40	88 – 118
PMS67	144 – 191
PMS2	132 – 152
PceGA59	181 – 226
PS08E08	172 – 185
UDP97-402	120 – 150
UDP96-005	100 – 140

Atsauces:

- Cantini C., Iezzoni A.F., Lamboy W.F., Boritzki M., Struss D., 2001. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 205-209.
- Downey S.L. & Iezzoni A.F., 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 125(1): 76-80.
- Wunsch, A. & Hormaza, J.I., 2004. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity*, 89: 56-63.