

Національна академія аграрних наук України
Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннезнавства та сортовивчення

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОТИПІВ
СОНЯШНИКУ, СТІЙКИХ
ДО СУЛЬФОНІЛСЕЧОВИННИХ
ГЕРБІЦИДІВ, ЗА ДНК МАРКЕРОМ
ГЕНА *AHAS1***

Методичні рекомендації

Одеса
«Екологія»
2021

УДК 575.113.4:577.2:633.11:633.289
I-291

Розглянуто і затверджено до друку вченою радою Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (*протокол № 8 від 6 листопада 2020 р.*)

Авторка:

Солоденко А. Є., провідний науковий співробітник відділу загальної та молекулярної генетики СГІ — НЦНС, кандидат біол. наук, с. н. с.

Рецензенти:

Ведмедєва К. В., в.о. заступника директора з наукової роботи ІОК НААН, завідувачка лабораторії генетики та генетичних ресурсів, кандидат біол. наук, с. н. с.;

Попов В. М., директор ТОВ «Агроген Ново», кандидат біол. наук, доцент

Відповідальний за випуск: директор СГІ—НЦНС, член-кор. НААН **Соколов В. М.**

I-291 **Ідентифікація** генотипів соняшнику, стійких до сульфонілсечовинних гербіцидів, за ДНК маркером гена *AHAS1*: методичні рекомендації / авт.: А. Є. Солоденко ; СГІ —НЦНС. — Одеса : Екологія, 2021. — 16 с.

Описано спосіб ідентифікації стійких до гербіцидів сульфонілсечовинної групи генотипів соняшнику шляхом детекції ДНК маркера мутантного алеля гена *AHAS1*, асоційованого зі стійкістю до SU гербіцидів.

Методичні рекомендації можуть бути використані в генетико-селекційних дослідженнях для скринінгу ліній, гібридів, гібридних популяцій, що розщеплюються, для добору стійких до SU гербіцидів генотипів та у насінництві соняшнику.

УДК 575.113.4:577.2:633.11:633.289

© Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннезнавства
та сортовивчення (СГІ—НЦНС), 2021

ЗМІСТ

<i>Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень та термінів</i>	4
<i>Вступ</i>	4
1. ОПИС МЕТОДУ	5
2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ	6
2.1. Обладнання та матеріали	6
2.2. Виділення ДНК з індивідуальних зразків (насінин, проростків, тканин рослини)	6
2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції	7
2.4. Електрофоретичне розділення та візуалізація продуктів ампліфікації	8
2.5. Контроль результатів	9
3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	9
4. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ	10
<i>Список бібліографічних посилань</i>	10
<i>ДОДАТОК. Приготування необхідних розчинів</i>	11

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

ДНК	— дезоксирибонуклеїнова кислота
дНТФ	— дезоксинуклеозидтрифосфат
М	— моль
ПЛР	— полімеразна ланцюгова реакція
п.н.	— пари нуклеотидів
ПСА	— персульфат амонію
ТБЕ	— трис-боратний електрофорезний буфер
ТЕ	— буфер для розчинення ДНК
РНК	— рибонуклеїнова кислота
ТЕМЕД	— N,N,N',N'-тетраметилетилендіамин
Трис	— трис-(гідроксиметил)-амінометан
ЦТАБ	— цетилтриметиламонійбромід

ВСТУП

Порушення науково обґрунтованих оптимальних розмірів площ посіву соняшнику, значне перевантаження сівозмін цією культурою призвели до поширення і значної інтенсивності розвитку різноманітних бур'янів. Для реалізації потенційної продуктивності гібриди повинні мати генетично зумовлену стійкість до вискоєфективних гербіцидів. Відомі способи польової та лабораторної оцінки стійкості соняшнику до гербіцидів. Дані польових випробувань не завжди достовірні у зв'язку з тим, що польова стійкість залежить від агроєкологічних умов вирощування. До недоліків лабораторного способу оцінки треба віднести таке: досить тривалий термін проведення оцінки та її висока коштовність через використання кліматичних камер у зимовий період.

Із розвитком методів молекулярної генетики і геноміки, завдяки постійним збільшенням знань щодо структури геномів, значна увага приділяється розробці схем маркерної селекції (MAS — marker assistance selection, селекція за допомогою маркерів) та використанню технологій ДНК-маркування певних агрономічно важливих генів.

Новітні агротехнології захисту посівів соняшнику від бур'янів — Clearfield та ExpressSun, або Сумо — застосовують систему «гібрид — гербіцид», за якої першим елементом є використання гербіцидів групи імідазолінонів або сульфонілсечовини, а другим компонентом — ви-

рощування гібридів соняшнику з генетично зумовленою стійкістю до зазначених препаратів. Гербіциди, які належать до імідазолінонової та сульфонілсечовинної груп, інгібують фермент синтезу амінокислотних ланцюгів — синтазу ацетогідрокси кислоти (aceto-hydroxyacid synthase, AHAS), яка відома також як ацетолактатсинтаза (acetolactate synthase, ALS). Даний фермент є каталізатором першого етапу біосинтезу амінокислот з розгалуженим ланцюгом. Дія AHAS-інгібуючих гербіцидів призводить до фатального порушення метаболізму у чутливих до цих гербіцидів рослин. Стійкість до гербіцидів, які інгібують AHAS, виникає у рослин в результаті точкових мутацій в генах, що кодують синтез даного ферменту. Мутантні гени, які надають стійкості до AHAS-інгібуючих гербіцидів, інтрогресовані зі зразків дикорослих популяцій (ANN-PUR та ANN-KAN) в елітні інбредні лінії з метою створення стійких сортів та гібридів [Al-Khatib et al., 2000; Miller et al., 2004]. У соняшнику ідентифіковано три AHAS гени (AHAS1, AHAS2, AHAS3), досліджена молекулярна структура генів [Sala et al., 2008]. За секвенування гена AHAS1 ідентифіковано варіацію за кількістю [ACC]_n повторів [Kolkman et al., 2004]. За дослідження поліморфізму мікросателітної послідовності гена AHAS1 маркована низка ліній-джерел стійкості до ІМІ та SU гербіцидів [Солоденко, Файт, 2015] та підтверджена ефективність використання виявленого мікросателітного маркера гена AHAS1 для добору зразків зі стійкістю до сульфонілсечовинного гербіциду Гранстар [Солоденко, Ільченко, Вареник, 2018].

У даних методичних рекомендаціях пропонується спосіб ідентифікації зразків соняшнику, стійких до гербіцидів сульфонілсечовинної групи, шляхом детекції ДНК маркера мутантного алеля гена AHAS1.

1. ОПИС МЕТОДУ

Ідентифікація зразків соняшнику, які здатні проявляти стійкість до SU гербіцидів, проводиться шляхом аналізу спектрів ДНК, ампліфікованої за допомогою полімеразної ланцюгової реакції за мікросателітним локусом *pAHAS 16–17*, що дозволяє детекцію мутантного алеля гена AHAS1.

Задача вирішується за допомогою електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі продуктів ампліфікації геномної ДНК зразків соняшнику за локусом *pAHAS 16–17* та ідентифікації стійких до SU гербіцидів зразків за наявності в спектрі алеля розміром 191 п. н.

2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ

2.1. Обладнання та матеріали

Проведення аналізу потребує застосування такого обладнання: витяжна шафа; холодильник; бокс ламінарний для стерильних робіт; ваги лабораторні; водяна баня (термостат); змішувач (вортекс) з циркуляційно-вібраційним рухом для струшування і перемішування суміші у мікропробірках; рН-метр; джерело постійного струму з напругою 150–600 В; мікроцентрифуга (до 14000 об./хв); мішалка лабораторна електромагнітна з підігрівом; термоциклер; набір для вертикального електрофорезу; система відеодокументування електрофореграм з програмним забезпеченням; дозатори автоматичні змінного об'єму; мікропробірки поліпропіленові місткістю 0,2 мл, 0,5 мл, 1,5 мл; наконечники поліпропіленові для дозаторів змінного об'єму; посуд лабораторний скляний.

2.2. Виділення ДНК з індивідуальних зразків (насіння, проростків, тканин рослини)

Виділення ДНК проводять у витяжній шафі в одноразових гумових рукавичках за допомогою дозаторів змінних об'ємів із використанням одноразових поліпропіленових мікропробірок та наконечників. При роботі з речовинами алергенної (ЦТАБ) та нейротоксичної (акриламід) дії обов'язково використовують засоби захисту обличчя, рук, очей.

Для виділення ДНК зі зразків соняшника використовують сегменти насіння, проростків, тканин листя або стебла.

Сегменти насіння, проростків, тканин соняшника гомогенізують в мікропробірках об'ємом 1,5 мл у лізуючому буфері (20.0 мМ Na₃ЕДТА, 0.1 М тріс-НСІ рН 8.5 при 25 °С, 1.4 М NaCl, 2.0 % ЦТАВ) до повної мацерації тканин. Лізат інкубують 45 хв при 60 °С. Додають рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом), перемішують до утворення білої емульсії. Центрифугують 5 хв при 14000 об./хв на мікроцентрифузі, водну фазу переносять в чисті мікропробірки. Додають рівний об'єм ізопропілового спирту, перемішують. Осаджують ДНК центрифугуванням при 10000 об./хв протягом 4 хв на мікроцентрифузі. Додають до осаду ДНК 0,5 мл етилового спирту (70 % розчин), центрифугують при 10000 об./хв протягом 4 хв

на мікроцентрифузі. Осад ДНК підсушують при кімнатній температурі 15 хв та розчиняють в 0,3 мл ТЕ-буферу (10.0 мМ тріс-НСІ, 1.0 мМ Na₃ЕДТА).

Розчин ДНК зберігають в холодильнику за 4 °С протягом проведення дослідження.

2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції

ПЛР здійснюють в одноразових поліпропіленових мікропробірках. Приготування ПЛР-суміші проводять в одноразових гумових рукавичках у боксі з використанням одноразових наконечників.

Формують ПЛР-суміш для необхідної кількості зразків з урахуванням контрольних проб. Кінцеві концентрації компонентів ПЛР-суміші такі: однократний буфер для *Taq*-полімерази, 0.2 мМ суміш дНТФ, по 0.25 мкМ прямого та зворотного праймерів, 0.5 одиниці активності *Taq*-полімерази. Об'єм ПЛР-суміші для кожного зразка має дорівнювати 18 мкл.

ПЛР-суміш перемішують на змішувачі вортекс та центрифугують при 1500 об./хв 10 с для видалення повітряних бульбашок. Утворення піни або бульбашок під час перемішування не допускається.

У кожен мікропробірку (кількість яких відповідає кількості зразків з урахуванням контрольних проб) вносять аліквоту отриманої ПЛР-суміші об'ємом 18 мкл. Додають 2 мкл розчину ДНК, що виділена згідно з розділом 2.2 зі зразків, які аналізують. В мікропробірку позитивної контрольної проби додають розчин ДНК, що виділена згідно з розділом 2.2 зі зразка лінії SURES-2 (носії мутантного алеля гена *AHAS1*; в мікропробірку негативної контрольної проби замість розчину ДНК додають 2 мкл бідистильованої води. Поверх реакційної суміші нашаровують 20 мкл мінеральної олії. Центрифугують при 1500 об./хв 10 с.

Підготовлені проби переносять в штатив термоциклера. Температурний режим ампліфікації такий: початкова денатурація — 3 хв при 94 °С, далі 1 хв при 94 °С; гібридизація праймерів — 1 хв при 60 °С; елонгація — 2 хв при 72 °С, фінальна елонгація — 10 хв. Кількість циклів — 35.

У таблиці 1 наведено інформацію про послідовність праймерів для ампліфікації ДНК за локусом *pAHAS 16–17*.

Таблиця 1

Праймери для детекції алелів гена *AHAS1*

Послідовність прямого (П) та зворотного (З) праймерів (5'-3')	
П	CCCTTTCACTTCCTATTTTCTATTCA
З	CTAAGAGGGGTCGGTATGATTTCT

2.4. Електрофоретичне розділення та візуалізація продуктів ампліфікації

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводять в камерах для вертикального електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі. Гель заливають у форми, як описано в інструкції користувача обладнання. Камеру для електрофорезу заповнюють 1 x TBE розчином.

У лунки планшети вносять по 3 мкл розчину для нанесення (кількість лунок має відповідати кількості зразків з урахуванням контрольної проби та маркера довжини фрагментів ДНК). В якості маркера довжини фрагментів рекомендовано використовувати ДНК pUC 19, яка рестрикована MspI (розміри фрагментів (п.н.): 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67).

Після закінчення ПЛР з кожної мікропробірки з-під шару олії автоматичним дозатором відбирають по 10 мкл суміші та переносять в лунки планшети для нанесення ДНК з розчином для нанесення. Змінюють наконечник для кожної проби. У три лунки планшети з розчином для нанесення вносять по 5 мкл розчину маркера довжини фрагментів ДНК. Перемішують ПЛР-суміш з розчином для нанесення шляхом піпетування (поява піни або бульбашок під час перемішування не допускається) та вносять в лунки гелевої пластини. У три лунки гелевої пластини (у дві крайні та одну посередині) вносять розчин маркера довжини фрагментів ДНК. Електрофорез проводять за стабільної напруги 5–10 В/см протягом 1,5–2,5 год. залежно від довжини фрагментів ампліфікації. Припиняють електрофорез згідно з довжиною пробігу ксиленціанолу FF, який входить до складу розчину для нанесення. Приблизний розмір ампліфікованих фрагментів ДНК, разом з якими рухається ксиленціанол FF у 10 % поліакриламідному гелі, складає 80 п.н.

Для візуалізації продуктів ампліфікації гелеву пластину промивають бідистильованою водою та витримують 10 хв у 10 % розчині етилового спирту. Переносять гелеву пластину на 6 хв у 1 % розчин азотної кислоти, після чого її промивають бідистильованою водою

5 хв. Переносять гелеву пластину у розчин срібла азотнокислого та витримують протягом 20 хв у темряві, після чого промивають гелеву пластину двічі бідистильованою водою та переносять в охолоджений до 4 °С відновлюючий розчин до появи забарвлення фрагментів ампліфікації та фрагментів маркера. Після появи чітких смуг (фрагментів ампліфікації та маркера) гелеву пластину промивають кілька разів дистильованою водою, після чого кладуть на 5 хв у 10 % розчин оцтової кислоти, потім ретельно промивають 2 хв у дистильованій воді.

Гелеву пластину розмішують між двома листами прозорої поліетиленової плівки та зберігають у холодильнику за 4 °С протягом проведення дослідження.

Отримані електрофореграми документують цифровим фотоапаратом. Розміри фрагментів ампліфікації визначають за комп'ютерною програмою «Gelanalyzer» (у вільному доступі в мережі Internet) згідно з маркером довжини фрагментів ДНК.

2.5. Контроль результатів

Електрофоретичний спектр, який відповідає негативній контрольній пробі, має характеризуватися відсутністю будь-яких фрагментів. У протилежному випадку дослідження необхідно повторити, починаючи з етапу проведення ПЛР.

Електрофоретичний спектр, який відповідає позитивній контрольній пробі, має містити фрагмент ДНК розміром 191 п.н.

3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За результатами ПЛР-аналізу мікросателітного локуса *pAHAS 16–17* встановлюють наявність чи відсутність фрагмента розміром 191 п.н. у спектрі ампліфікації ДНК зразка соняшника. Наявність фрагмента розміром 191 п.н., який асоційовано з мутантним алелем гена *AHAS1*, свідчатиме про те, що даний зразок соняшника є стійким до SU гербіцидів.

На рис. 1 наведені спектри ампліфікації ДНК, яка була виділена зі зразків лінії SURES-2, лінії OC1029B та сегрегантів популяції F₂ від схрещування SURES-2 x OC1029B з різним проявом стійкості до SU гербіцида Гранстар. Стрілкою позначено фрагмент ампліфікації розміром 191 п.н.

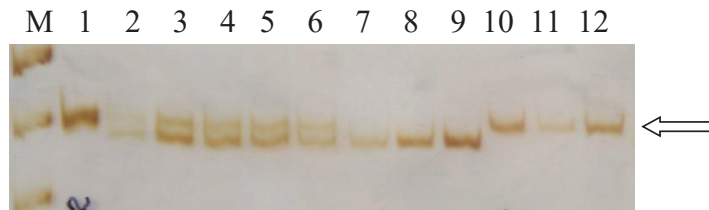


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації за маркерним мікросателітним локусом *rAHAS 16–17* ДНК, виділеної з листків рослин SURES-2 (доріжки 1, 12), нестійкої до Гранстару лінії OC1029B (9), сегрегантів F₂ від схрещування SURES-2 x OC1029B (2–8, 10, 11). М — маркер довжини фрагментів ДНК GeneRuler 50 bp (фрагменти 150, 200, 250 п.н.)

Для кожного сегреганта з популяції F₂ від схрещування SURES-2 x OC1029B підтверджено асоціацію між наявністю в генотипі алеля 191 п.н. за локусом *rAHAS 16–17* та проявом стійкості до SU гербіцида Гранстар.

4. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Застосування ДНК-детекції мутантного алеля гена *AHAS1* рекомендується проводити:

- 1) при оцінці вихідного селекційного матеріалу;
- 2) при доборі з популяцій, створених з метою інтрогресії гена стійкості до SU гербіцидів *AHAS1*;
- 3) при рутинній оцінці ліній та гібридів соняшнику на наявність генетичних детермінант стійкості до SU гербіцидів;
- 4) для верифікації результатів польових та лабораторних випробувань.

СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Al-Khatib K., Miller J. F. Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidasolinone herbicides. *Crop. Sci.* 2000. V. 40. P. 869–870.
2. Miller J. F., Al-Khatib K. Two express resistant sunflower genetic stocks. *Crop. Sci.* 2004. V. 44. P. 1037.

3. Sala C. F., Bulos M., Altieri E., Ramos M. L. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. Proc. 18th Int. Sunfl. Conf., Mardel Plata, Argentina. 2012. P. 75–81.
4. Kolkman J., Slabaugh M., Bruniard J., Berry S., Bushman B., Olungu C., Maes N., Abratti G., Zambelli A., Miller J., Leon A., Knapp S. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. P. 1147–1159.
5. Солоденко А. Є., Файт В. І. Маркери гена *AHAS1* для використання в селекції соняшника на стійкість до гербіцидів. *Вісник Харківського національного аграрного університету*. Серія: Біологія. Харків, 2015. Вип. 3 (36). С. 71–75.
6. Солоденко А. Є., Ільченко А. С., Вареник Б. Ф. Ефективність мікросателітного маркера *rAHAS 16–17* при інтрогресії гена *AHAS1* стійкості до гербіцидів в селекційний матеріал соняшнику. *Вісник Харківського національного аграрного університету*. Серія: Біологія. Харків, 2018. Вип. 2 (44). С. 94–99.

ДОДАТОК

Приготування необхідних розчинів

Розчин ЦТАБ з масовою часткою 10 %

Наважку ЦТАБ масою 100 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють в 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 визначають 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 в 900 мл бідистильованої води. Розчин збовтують на електромагнітній мішалці до повного розчинення препарату.

Розчин трісу з молярною концентрацією 1 моль/л, рН 7,5

Наважку трісу масою 121,1 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють в 750 мл бідистильованої води. Доводять рН до необхідного значення (рН 7,5) додаванням концентрованої соляної кислоти, кількість якої складає приблизно 70 мл. Остаточне доведен-

ня рН виконують застосуванням рН-метра після охолодження розчину до кімнатної температури (20 °С), потім додають бідистильовану воду до мітки.

Розчин Na_3EDTA з молярною концентрацією 0,5 моль/мл

Наважку Na_3EDTA масою 186,12 г засипають до мірної колби місткістю 1000 мл і розчиняють в 750 мл бідистильованої води, інтенсивно перемішують на електромагнітній мішалці. Доводять рН до 8,0 додаванням NaOH з масовою часткою 98,5 % (приблизно 40 г). Остаточне доведення рН виконують за рН-метром, після чого додають бідистильовану воду до мітки.

Розчин 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 трісу з молярною концентрацією 1 моль/мл, рН 7,5, 8 мл розчину Na_3EDTA з молярною концентрацією 0,5 моль/л і доводять бідистильованою водою до мітки, ретельно перемішують.

Суміш хлороформ-ізоаміловий спирт

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

Розчин етилового спирту 70 %

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

Розчин ТЕ

До мірної колби місткістю 200 мл додають 0,4 мл розчину Na_3EDTA , 1 мл розчину тріс, рН 7,5, доводять бідистильованою водою до мітки.

Розчин 10 х ТБЕ

Наважки трісу масою 108 г та кислоти борної масою 55 г засипають у мірну колбу місткістю 1000 мл і розчиняють у 800 мл бідистильованої води. Розчин збовтують на електромагнітній мішалці до повного розчинення, після чого додають 40 мл розчину Na_3EDTA та доводять бідистильованою водою до мітки.

Розчин 1 х ТБЕ

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

Розчин поліакриламід у з масовою часткою 30 %

Наважки акриламід масою 29 г та бісакриламід масою 1 г засипають до мірної колби місткістю 100 мл, додають 80 мл бідистильо-

ваної води і розчиняють, збовтуючи на електромагнітній мішалці за температури до 60 °С до повного розчинення препарату. Після розчинення доводять бідистильованою водою до мітки.

Розчин 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 з масовою часткою 10 %

Для приготування одного гелю розмірами 160 x 180 x 1 мм змішують 8 мл розчину поліакриламід у з масовою часткою 30 %, 2,4 мл розчину 10 х ТБЕ, 13,6 мл бідистильованої води, 0,012 мл TEMED, 0,01 мл розчину ПСА.

Розчин бромфенолового синього

Наважку бромфенолового синього масою 250 мг засипають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають мірним циліндром 8 мл бідистильованої води і розчиняють. Після розчинення 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 розчинення доводять до мітки бідистильованою водою.

Розчин для нанесення

До колби 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 10 %

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

Розчин кислоти азотної 1 %

Кислоту азотну концентровану об'ємом 14 мл вливають 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 вливають 200 мл розчину натрію вуглекислого і вносять автоматичним дозатором 0,1 мл формаліну. Розчин ретельно перемішують.

Науково-методичне видання

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОТИПІВ
СОНЯШНИКУ, СТІЙКИХ
ДО СУЛЬФОНІЛСЕЧОВИННИХ
ГЕРБІЦИДІВ, ЗА ДНК МАРКЕРОМ
ГЕНА *AHAS1***

Методичні рекомендації

Авторка
Солоденко А. Є.

Завідувачка редакції *Т. М. Забанова*
Редактор *В. Я. Крижанівський*

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0,93.
Тираж 100 прим. Зам. № 107.

Видавництво і друкарня «Екологія»
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 23/1
Тел.: (0482) 33-07-18, 37-14-25, 7-855-855

e-mail: astro_print@ukr.net; www.astroprint.ua; www.stranichka.in.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК No1873 від 20.07.2004 р.