Збірник наукових праць СГІ – НЦНС, вип. 21 (61)

УДК 633.791:575.113

А. М. ВЕНГЕР, Н. Е. ВОЛКОВА

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр
насіннєзнавства та сортовивчення

ВИЗНАЧЕННЯ СТАТІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (*Humulus lupulus* L.) ЗА МОЛЕКУЛЯРНИМИ МАРКЕРАМИ

Досліджено поліморфізм мікросателітного локусу HlAGA7 у вибірці зразків хмелю звичайного колекції Інституту сільського господарства Полісся НААН; визначено відсутність зв'язку певних алелів HlAGA7 зі статтю. Оцінено можливість використання специфічного для Y-хромосоми STS-маркера для встановлення статі хмелю звичайного.

Ключові слова: *хміль звичайний, стать, молекулярні маркери, полімеразна ланцюгова реакція*

Вступ. Вивчення генетичних систем детермінації статі у рослин викликає інтерес з точки зору теоретичного розуміння феномену статі і є актуальним для селекційної практики. Одним з популярних рослинних об'єктів зі статевими хромосомами є представники роду *Humulus* – хміль звичайний (*H. lupulus* L.), який має господарське значення для людини, та декоративний хміль японський (*H. japonicus* Siebold & Zucc.).

Статеві хромосоми видів роду *Humulus* знаходяться на пізній стадії еволюції статевих систем і є зручними моделями для вивчення цієї стадії [1]. Застосування сучасних методів молекулярної генетики, біотехнології, біоінформатики на малодосліджених у цьому плані геномах рослин роду *Humulus* робить значний внесок в теоретичне розуміння феномену статі у рослин [2].

З іншого боку, крім значної теоретичної важливості, молекулярно-генетичний аналіз статевих хромосом хмелю має значення для селекції цієї важливої сільськогосподарської культури. Швидка ідентифікація статі хмелю є необхідним етапом для розмноження цієї рослини, так як тільки незапліднені квітки жіночих рослин – шишки є незамінною сировиною для броварництва – пріоритетного комерційного напряму використання хмелю. Також шишки – унікальна рослинна сировина завдяки наявності комплексу специфічних смол, поліфенольних сполук, ефірних масел і біологічно активних речовин, які мають не тільки смакові і ароматичні, але і антибіотичні, антиокислювальні та лікувальні властивості [3].

Традиційно визначення статі рослин хмелю проводять за морфологією чоловічих та жіночих квіток: за умови високого рівня живлення та вирощування у теплиці сіянці зацвітають в перший рік життя, якщо сіянці висаджено у полі – на

другий рік. Таким чином, протягом одного року в теплиці чи двох років в полі селекціонер вимушений вирощувати близько 50% баластних (чоловічих) рослин.

Труднощі з визначенням статі на ранніх стадіях розвитку рослин стимулюють молекулярно-генетичні дослідження статевих хромосом [4-8]. Мета нашої роботи полягала у дослідженні молекулярно-генетичного поліморфізму мікросателітного локусу *HlAGA7* у вибірці сортів та зразків хмелю звичайного колекції Інституту сільського господарства Полісся НААН України та виявлені можливості використання певних алелів як молекулярних маркерів статі. Для досягнення поставленої мети виконували завдання: молекулярно-генетичний аналіз сортів та зразків хмелю за локусом *HlAGA7*; визначення зв'язку певних алелів локусу *HlAGA7* зі статтю.

Матеріали і методи. Матеріалом досліджень слугували зразки хмелю звичайного чоловічої статі восьми колекційних номерів 1з 63-2-3, 1к 64-1-1, 2з 63-2-7, 2к 64-2-5, 3з 65-6-1, 4з 68-3-1, 5к 67-3-1, 6к 67-4-8 та зразки жіночої статі восьми сортів: Житомирський 75, Клон 18, Ксанта, Кумир, Надія, Оболонський, Оскар, Хмелеслав селекції Інституту сільського господарства Полісся НААН.

ДНК виділяли з фрагментів листя за методом [10].

Полімеразні ланцюгові реакції (ПЛР) проводили у 0,5 мл-мікропробірках на термоциклері "Терцик" («ДНК-технологія», РФ). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 10 х ПЛР-буфер (0,2 М Трис-HCl pH 8,4; 0,5 М КС1; 0,01 % Твін-20); 2,5 мМ $MgCl_2$; по 0,2 мМ кожного дНТФ; по 0,2 мкМ прямого та зворотного праймерів; 60 нг ДНК; 1 од. ДНК-полімерази *Taq*. На реакційну суміш нашаровували 20 мкл мінеральної олії. Кожну постановку ПЛР супроводжували негативним контролем (реакційна суміш, що не містила ДНК). Послідовності праймерів та відповідні температурно-часові режими ПЛР згідно [9, 11].

Електрофорез в 2%-х агарозних (локус Y-хромосоми) та 7%-х поліакриламідних (локус *HlAGA7*) гелях та візуалізацію продуктів ампліфікації проведено за загальноприйнятими методиками. Довжини продуктів ампліфікації розраховували за допомогою системи документації і аналізу гелів «Image Master VDS» («AmershamPharmacia Biotech», СКВ) згідно з інструкцією користувача.

Результати дослідження та їх обговорення. Для молекулярно-генетичного дослідження обрано мікросателітний локус *HlAGA7* для виявлення можливості використання певних алелів як маркерів статі хмелю звичайного, для чого проведено ПЛР-аналіз 16 зразків хмелю звичайного чоловічої та жіночої статі (рис. 1).

При ПЛР-аналізі зразків чоловічої статі визначено три алеля локусу *HlAGA7* довжиною 180, 189 та 213 п.н., причому сім зразків мали генотип 180-189 п.н. і один зразок – 180-213 п.н. Для вибірки зразків жіночої статі встановлено чотири алеля довжиною в діапазоні 183-225 п.н. (табл.).

За результатами досліджень Покорна [12] серед 142 сортів хмелю звичайного різного походження визначено 10 алелів локусу *HlAGA7* довжиною в діапазоні 173-232 п.н. Джакс зі співавторами [9] при ПЛР-аналізі 174 генотипів хмелю звичайного

різного еколого-географічного походження за локусом *HIAGA7* встановив 35 алелів розмірами 157-249 п.н. За результатами нашого дослідження встановлено шість алелів локусу *HIAGA7*, розміри яких варіювали у діапазоні від 180 до 225 п.н.

Проаналізована можливість використання певних алелів локусу *HIAGA7* як статеспецифічних маркерів, виходячи з даних Джакс зі співавторами [9]. Автори встановили при аналізі розподілу алелів локусу *HIAGA7* в групах зразків чоловічої та жіночої статі, що у зразків чоловічої статі ампліфікуються чоловічоспецифічні алелі довжиною 165 п.н. або 210 п.н. (для європейської або азіатської та американської зародкової плазми відповідно) та інший алель Х-хромосоми (чоловічі зразки завжди є гетерозиготними); у зразків жіночої статі ампліфікуються один або два (гомозигота або гетерозигота) нечоловічоспецифічні алелі [9]. У нашому дослідженні не виявлено алелів довжиною 165 та 210 п.н. ані в зразках жіночої статі, ані в зразках чоловічої статі. Отримані нами результати не співпадають з очікуваними за літературними даними. Таким чином, розглядати алелі локусу *HIAGA7* як потенційні маркери статі неможливо.

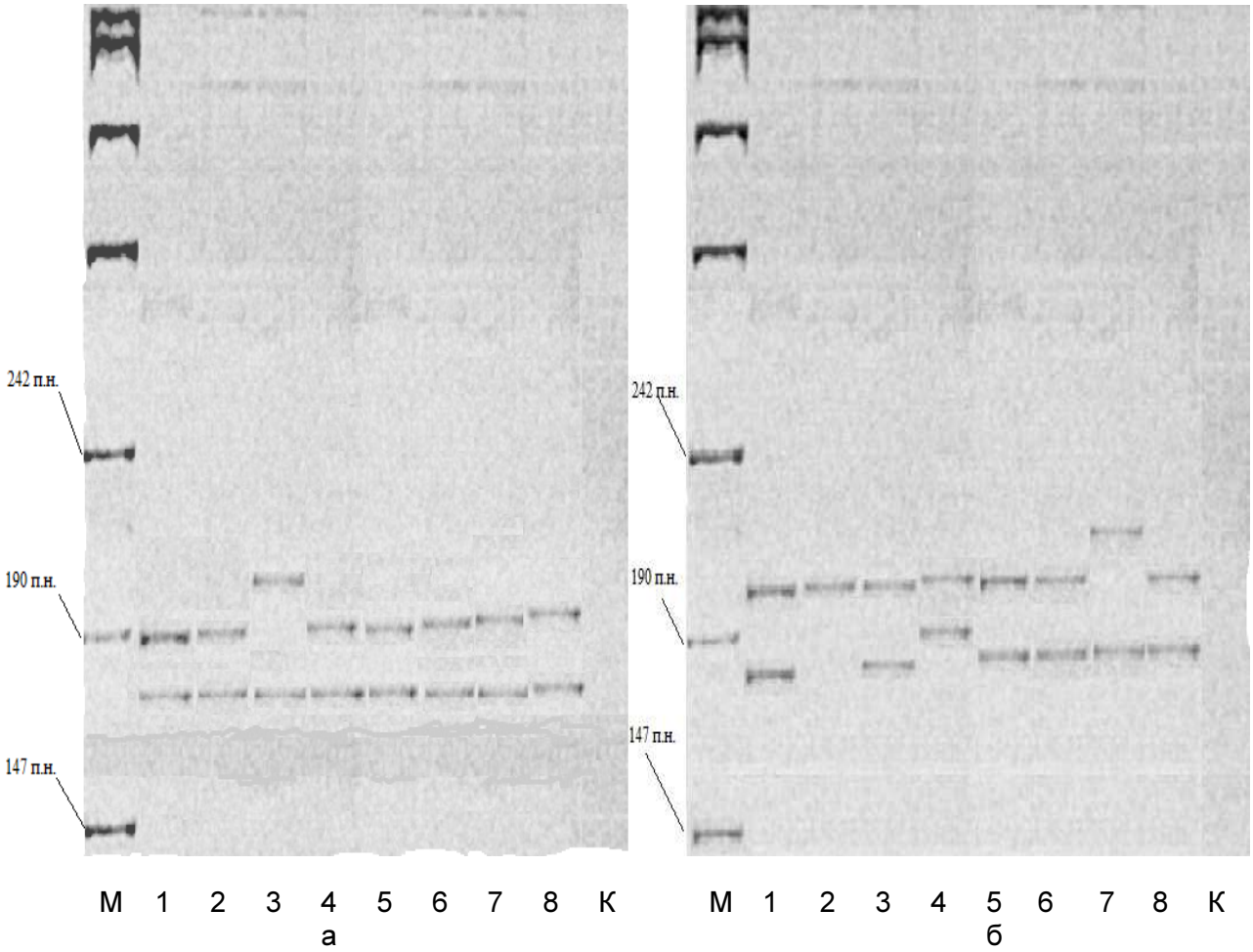

Рис. 1. Електрофоретичні профілі продуктів ампліфікації: локус *HIAGA7*; зразки хмелю звичайного (а) чоловічої статі колекційних номерів 3з 65-6-1 (1), 2к 64-2-5 (2), 1к 64-1-1 (3), 2з 63-2-7 (4), 1з 63-2-3 (5), 5к 67-3-1 (6), 6к 67-4-8 (7), 4з 68-3-1 (8) та (б) жіночої статі сортів Надія (1), Оскар (2), Клон 18 (3), Оболонський (4), Хмелеслав (5), Кумир (6), Ксанта (7), Житомирський 75 (8). М – маркер молекулярної маси pUC19 DNA/MspI. К – негативний контроль (ПЛР-суміш без ДНК)

Таблиця

Поліморфізм мікросателітного локусу *HlAGA7* хмелю звичайного

Зразок чоловічої статі колекційних номерів	Довжина фрагментів ампліфікації локусу *HlAGA7,* п.н.	Зразок жіночої статі сорту	Довжина фрагментів ампліфікації локусу *HlAGA7*, п.н.
3з 65-6-1	180, 189	Надія	183, 207
2к 64-2-5	180, 189	Оскар	207, 207
1к 64-1-1	180, 213	Клон 18	183, 207
2з 63-2-7	180, 189	Оболонський	189, 207
1з 63-2-3	180, 189	Хмелеслав	183, 207
5к 67-3-1	180, 189	Кумир	183, 207
6к 67-4-8	180, 189	Ксанта	183, 225
4з 68-3-1	180, 189	Житомирський 75	183, 207

Неможливість використання певних алелів мікросателітного локусу *HlAGA7* як маркерів статі призвела до необхідності пошуку іншого статеспецифічного маркера та його перевірки на вибірці зразків української селекції. За літературними даними, для визначення статі можливо використовувати маркер, розроблений для детекції регіону Y-хромосоми; результатом ПЛР-аналізу буде наявність / відсутність фрагмента ампліфікації при тестуванні чоловічого / жіночого зразків відповідно. Полі з співавторами [7] на основі чоловічоспецифічного RAPD-фрагменту OPJ9 розробили STS-маркер, специфічний до Y-хромосоми. При ПЛР-аналізі за даним маркером в зразках чоловічої статі відбувається ампліфікація фрагмента довжиною 1150 п.н., тоді як в зразках жіночої статі продукти ампліфікації відсутні. Патзак з співавторами [11] використали цей маркер для оцінки 770 генотипів F_1-потомства трьох схрещувань та успішно встановили стать у ювенальних рослин хмелю. Даний маркер обрано нами для оцінки можливості його використання як статеспецифічного у вибірці зразків хмелю звичайного української селекції.

При ПЛР-аналізі 16 зразків хмелю звичайного за маркером STS продукт ампліфікації довжиною 1150 п.н. отримано для всіх зразків чоловічої статі і не отримано для зразків жіночої статі (рис. 2). Слід зазначити, що відсутність продуктів ампліфікації у зразках жіночої статі не пов’язана з «неякісною» матричною ДНК, так як при мікросателітному аналізі даних сортів за локусом *HlAGA7* продукти ампліфікації отримано для всіх жіночих зразків, а також в попередніх дослідженнях для даних сортів отримано молекулярно-генетичні паспорти [13]. Тобто виключено псевдонегативний результат щодо зразків жіночої статі. Таким чином, на вибірці зразків хмелю української селекції підтверджено, що маркер STS дозволяє ідентифікувати стать.

Позитивним моментом при використанні даного маркера є можливість розподілу продуктів ампліфікації у 2%-у агарозному гелі, що значно спрощує та скорочує процес визначення статі.

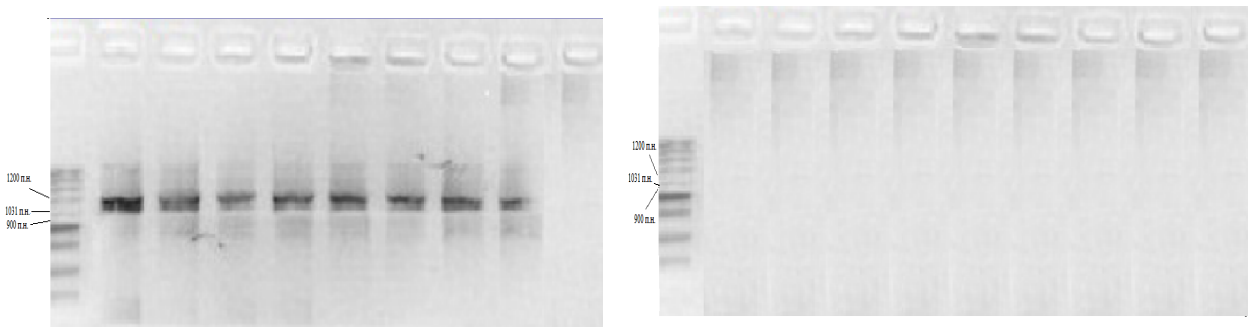

Рис. 2. Електрофоретичні профілі продуктів ампліфікації: (а) STS-локус Y-хромосоми; зразки хмелю звичайного чоловічої статі колекційних номерів 3з 65-6-1 (1), 2к 64-2-5 (2), 1к 64-1-1 (3), 2з 63-2-7 (4), 1з 63-2-3 (5), 5к 67-3-1 (6), 6к 67-4-8 (7), 4з 68-3-1 (8); (б) STS-локус Y-хромосоми; зразки хмелю звичайного жіночої статі сортів Надія (1), Оскар (2), Клон 18 (3), Оболонський (4), Хмелеслав (5), Кумир (6), Ксанта (7), Житомирський 75 (8). М – маркер молекулярної маси GeneRuler DNA Ladder mix. К – негативний контроль (ПЛР-суміш без ДНК)

Процедура з використанням STS-маркера є швидкою і маловитратною, що має значення для експрес-діагностики великої кількості зразків. Перевагою методу також є добір для аналізу незначної кількості вихідного рослинного матеріалу, що дозволяє залишити рослину життєздатною для подальшого дорощування дібраних зразків. Впровадження молекулярних маркерів для визначення статі в програми селекції хмелю, так званий добір за молекулярними маркерами (Marker Assisted Selection), підвищить ефективність селекції і дозволить скоротити витрати праці, площ, часу.

Висновки. За результатами дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму мікросателітного локусу *HIAGA7* використовувати його алелі як маркери статі хмелю звичайного неможливо внаслідок відсутності зв'язку наявності певного алеля (алелів) тільки у зразків певної статі. STS-маркер регіону Y-хромосоми є придатним для диференціації зразків хмелю звичайного за статтю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ming R. Sex chromosomes in flowering plants / R. Ming, J. Wang, P. Moore, A. Patterson // American journal of botany. – 2007. – V. 94. – P. 141-150.
2. Divashuk M. G. Molecular cytogenetic mapping of *Humulus lupulus* sex chromosomes / M. G. Divashuk, O. S. Olexandrov, P. Y. Kroupin, G. I. Karlov // Cytogenetic and Genome Research. – 2011. – V. 134 – P. 213-219.
3. Ляшенко И. Физиология и биохимия хмеля / Н. И. Ляшенко, Н. Г. Михайлов, Р. И. Рудык. – Житомир: "Полісся", 2004. – С. 90-210.
4. Buck E. J. Validation of new sex specific DNA markers for hops (*Humulus lupulus* L.) / E. J. Buck, C. Wiedow, C. Carlisle, D. Chagné, R. Beatson // Acta Horticulturae. – 2009. – V. 848. – P. 323-328.

5. Cerenak A. Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content / A. Cerenak, Z. Satovic, B. Javornik // Genome. – 2006. – V. 49 (5). – P. 485-494.
6. Danilova T. V. Application of inter simple sequence repeat (issr) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.) / T. V. Danilova, G. I. Karlov // Euphytica. – 2006. – V. 151 (1). – P. 15-21.
7. Polley A. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers / A. Polley, E. Seigner, M. Ganal // Genome. – 1997. – V. 40. – P. 357-361.
8. Seefelder S. Genome analysis in hops - a powerful method for improving anessential raw material for brewing / S. Seefelder, K. Kammhuber, A. Lutz, B. Engelhard, E. Seigner // Proceedings of the 30th EBC congress. – Praque, 2005. – V. 30. – P. 1-8.
9. Jakse J. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.) / J. Jakse, N. Stajner, P. Kozjak, A. Cerenak, B. Javornik // Mol. Breeding. – 2008. – V. 28. – P. 139-148.
10. Okada Y. Construction of gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter / Y. Okada, K. Saeki, A. Inaba, N. Suda, T. Kaneko, K. Ito // Plant Physiol. – 2003. – V. 160. – P. 1101-1108.
11. Patzak J. Identification of sex in F_1 progenies of hop (*Humulus lupulus* L.) by molecular marker / J. Patzak, P. Vejl, S. Skupinova, V. Nesvadba // Rostlinna Vyroba. – 2002. – V. 48 (7). – P. 318-321.
12. Pokorn T. Genotipizacija kultivarjev hmelja fluorescentnimi mikrosatelitnimi markerji / T. Pokorn // Dipl. delo. Ljubljana. Univ. v Ljubljani. – 2011. – P. 23.
13. Сиволап Ю.М. Сучасні біотехнології в оцінці генетичного різноманіття українських сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) / Ю.М. Сиволап, О.О. Захарова, Н.Е. Кожухова, С.О. Ігнатова, М.С. Приставський // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44 (5). – С. 3-12.

Надійшла 28.03.2013 р.