

УДК 633.791:575.113

А. М. ВЕНГЕР, мол. наук. співроб.,  
Н. Е. ВОЛКОВА, д. б. н., с. н. с., гол. наук. співроб.,  
СГІ–НЦНС, Одеса  
venger87@ukr.net

## **МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ В СЕЛЕКЦІЇ ТА РОЗСАДНИЦТВІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (*Humulus lupulus L.*)**

*Проаналізовано молекулярно-генетичний поліморфізм ділянок ядерного геному хмелю звичайного, пов'язаних з синтезом цінних вторинних метаболітів та проявом статі, а також мікросателітних локусів. Визначено залежність між поліморфізмом генів, що кодують халконсинтази, та вмістом гірких речовин у шишках хмелю. Розроблено набори молекулярних маркерів для комплексної оцінки генотипу хмелю, зокрема для встановлення автентичності, визначення статі, типу сорту, реєстрації.*

Ключові слова: *хміль звичайний, гени, мікросателітні локуси, тип сорту, стать, молекулярні маркери.*

**Вступ.** Хмелярство — важлива складова економіки багатьох країн світу, зокрема й України. Хміль звичайний *Humulus lupulus L.* є джерелом найбільш специфічної, незамінної та найдорожчої сировини для пивоваріння, але завдяки наявності унікальних біоактивних компонентів хміль використовують також у харчовій промисловості, медицині, фармакології, парфумерії [1]. Важливість галузі хмелярства спонукає до застосування сучасних молекулярних біотехнологій для створення конкурентоспроможних сортів, що своєю чергою потребує розширення фундаментальних досліджень з геноміки культури. Вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму різних фракцій геному хмелю та розробка молекулярних маркерів необхідні для ідентифікації сортів та нового селекційного матеріалу, контролю автентичності та генетичної чистоти сортів, маркерного добору носіїв певних генів агрономічно важливих ознак, визначення соматональної варіабельності та генетичної стабільності, генетичного картування, детекції та діагностики патогенів [2].

Найціннішою частиною рослини хмелю є шишки завдяки наявності комплексу специфічних смол, поліфенольних сполук, ефірних масел і біологічно активних речовин, які мають не тільки смакові й ароматичні, але також антибіотичні, антиокислювальні та лікувальні властивості. В залежності від рівня ксантогумолу в шишках сорти хмелю звичайного поділяють на гіркі та ароматичні. Головна ціль селекції хмелю полягає в поліпшенні вмісту та якості вторинних метаболітів, що акумулюються в

лупулінових зернах шишок [3]. Тому актуальним є дослідження поліморфізму генів, пов'язаних з біосинтезом цих речовин.

Сучасний рівень захисту авторських прав вимагає використання ідентифікації та реєстрації сорту за молекулярними маркерами.

У промислових цілях культивують жіночі рослини хмелю, які розмножують вегетативно. Чоловічі рослини використовують тільки в селекції, зокрема в гібридизації. Визначають стать рослин фенотипово на другий рік вирощування. Тому важливим для селекції та розсадництва є раннє тестування статі перед висадкою [4]. Також важливо забезпечити розмноження селекційного матеріалу хмелю, вільного від фітопатогенів, передусім збудника бактеріального раку. Молекулярні біотехнології детекції фітопатогенів дозволяють проводити раннє та надійне виявлення ураження.

Отже, молекулярно-генетичні дослідження та розробка на основі одержаних результатів молекулярних маркерів для різноманітних напрямів селекції та розсадництва хмелю актуальні як з теоретичного, так і практичного аспектів.

**Мета:** розробити молекулярні маркери для оцінки зразків хмелю звичайного за складом і рівнем цінних вторинних метаболітів, статтю, ураженістю агробактеріями на основі дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму певних генів та локусів геному хмелю звичайного

**Матеріали і методи.** Матеріалом слугували жіночі зразки сортів хмелю звичайного селекції Інституту сільського господарства Полісся НААН України: Альта, Зміна, Ксанта, Кумир, Надія, Назарій, Оболонський, Поліський, Промінь, Чаклун (гіркі сорти), Видибор, Гайдамацький, Житомирський 75, Заграва, Клон 18, Оскар, Пивовар, Полісянка, Славянка, Хмелеслав (ароматичні сорти) та зразки хмелю звичайного чоловічої статі: 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.

Для біоінформатичних досліджень використано нуклеотидні послідовності генів *chs*\_H1 AJ304877, AM263199 (повні сиквенси), AM263200, AM263201, FJ554585 (мПНК); *chs2* AB061020 (повний сиквенс), AB061021, FJ554586 (мПНК); *chs3* AB061022 (повний сиквенс); *chs4* AJ430353 (повний сиквенс), FJ554587 (мПНК); *vps* (AB015430, AB047593, EU685789, EU685790, EU685791, EU685792, EU685793, EU685794, EU685795, EU685796, EU685797, EU685798, EU685799, EU685800, FJ554588) (повні сиквенси) з Національного центру біотехнологічної інформації (National centre of biotechnology information, NCBI).

Виділення ДНК з тканин хмелю звичайного, постановку полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), гель-електрофорез проводили за загальноприйнятими методами [5–8]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за [9]. Кластерний аналіз результатів ПЛР-дослідження сортів хмелю звичайного української селекції проводили за алгоритмом Clustal W., залежність між поліморфізмом генів, пов'язаних із синтезом ксантогумолу, та ознакою «тип сорту» обраховували за Спірманом [10].

**Результати.** На вибірках нуклеотидних послідовностей генів, що кодують халконсинтази, та 20 сортів хмелю звичайного проведено біоінформатичний та молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму генів, що зумовлюють наявність гірких речовин у шишках хмелю звичайного [11, 12].

За результатом кластерного аналізу побудовано дендрограму (рис.).

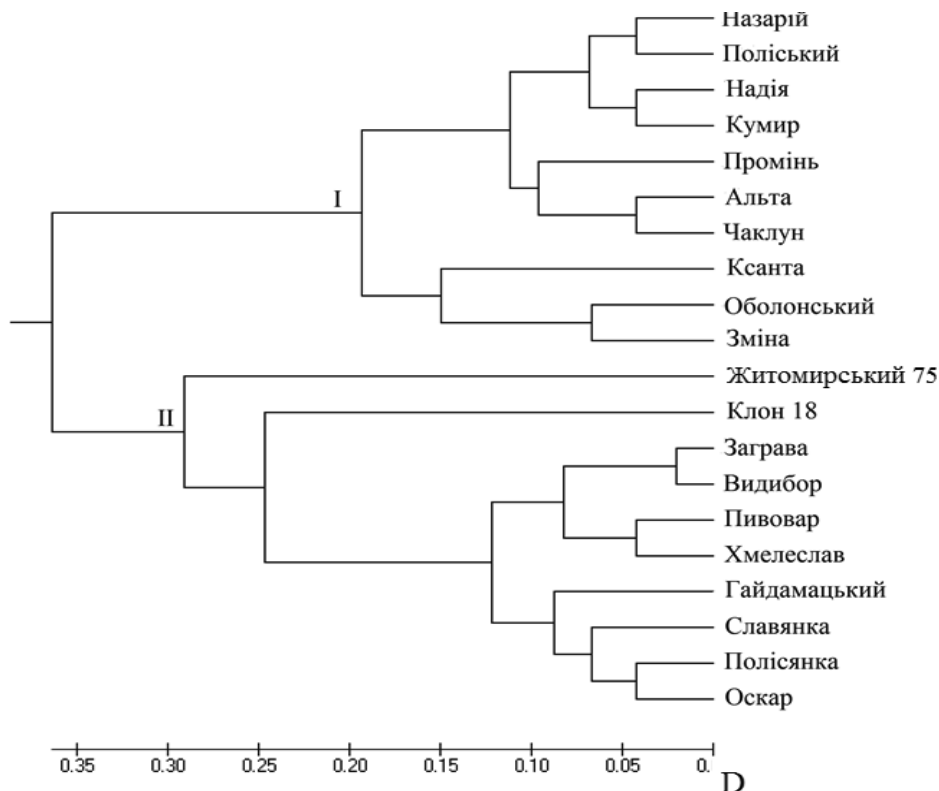


Рис. Генетичне різноманіття сортів хмелю звичайного української селекції, основане на поліморфізмі генів *chs\_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*. I, II — кластери

За кластерним аналізом відбувається чітка кластеризація сортів за їхнім типом. До кластера I увійшли всі гіркі сорти, до кластера II — всі ароматичні. Отже, виявлено залежність між поліморфізмом генів, пов'язаних із синтезом ксантогумолу, та ознакою «гіркий / ароматичний тип сорту» [13].

Молекулярно-генетичний аналіз певних ділянок Y-хромосоми хмелю звичайного дозволив виявити необхідність використання двох молекулярних маркерів: мікросателітного маркера *HIAGA7* як референтного для виключення псевдонегативних результатів та STS-маркера, специфічного для зразків чоловічої статі [14].

Ведення розсадництва хмелю включає технологію мікроклонального розмноження *in vitro*, що потребує контролю ураження фітопатогенами, в т. ч. збудником бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens*. Запро-

поновано двоетапну схему детекції агробактерії за молекулярними маркерами генів *virD2* та *ipt* [15].

У процесі відтворення і виробничого використання сортів в умовах довгострокової монокультури, вегетативного типу розмноження, при накопиченні і передачі збудників хвороб, негативного впливу фізико-хімічних і біологічних факторів можливі зміни генетичного матеріалу сорту, що призводить до зниження його продуктивності та погіршення якісних показників. Для контролю автентичності сорту, перевірки на сортову типовість, однорідність і вирівняність, а також для захисту авторських прав розроблено систему молекулярно-генетичної реєстрації сорту за молекулярними маркерами [16]. Формула сорту містить інформацію про алейний стан мікросателітних локусів та генів агрономічно важливих ознак.

Отже, розроблено набори молекулярних маркерів для комплексної оцінки генотипу хмелю звичайного. Їх використання дозволить підвищити ефективність селекції та розсадництва хмелю завдяки скороченню витрат праці, коштів, площ (в теплицях або полі) та часу.

**Висновки.** Теоретично та експериментально проаналізовано молекулярно-генетичний поліморфізм ділянок ядерного геному хмелю звичайного, пов'язаних з синтезом цінних вторинних метаболітів та проявом статі, а також мікросателітних локусів. Розроблено набори молекулярних маркерів для комплексної оцінки генотипу хмелю, зокрема для визначення автентичності, статі, типу сорту, реєстрації.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. McAdam E. Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry / E. McAdam, J. Freeman, S. Whittock [et al.] // BMC Genetics. — 2013. — Vol. 14. — P. 14–36.
2. McAdam E. Quantitative genetic parameters for yield, plant growth and cone chemical traits in hop (*Humulus lupulus* L.) / E. McAdam, R. Vaillancourt, A. Koutoulis [et al.] // BMC Genetics. — 2014. — Vol. 15. — P. 15–22.
3. Ляшенко Н. И. Физиология и биохимия хмеля / Н. И. Ляшенко, Н. Г. Михайлов, Р. И. Рудык. — Житомир : Полісся, 2004. — С. 90–210.
4. Divashuk M. Molecular cytogenetic mapping of *Humulus lupulus* sex chromosomes / M. Divashuk, O. Olexandrov, P. Kroupin [et al.] // Cytogen. Genome Res. — 2011. — Vol. 134. — P. 213–219.
5. Okada Y. Molecular cloning and expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene responsible for essential oil biosynthesis in hop (*Humulus lupulus*) / Y. Okada, M. Sugimoto, I. Kazutoshi // J. Plant Physiol. — 2001. — Vol. 158 (9). — P. 1183–1188.
6. Patzak J. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.) / J. Patzak, I. Vrba, J. Matousek // Genome. — 2007. — Vol. 50. — P. 15–25.
7. Jakse J. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.) / J. Jakse, Z. Satovic, B. Javornik // Genome. — 2004. — Vol. 47. — P. 889–899.

8. Polley A. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers / A. Polley, E. Seigner, M. Ganai // Genome. — 1997. — Vol. 40. — P. 357–361.
9. Smith S. Identification of common molecular subsequences / S. Smith, M. Waterman // J. Mol. Biol. — 1981. — Vol. 147. — P. 195–197.
10. Spearman C. The proof and measurement of association between two thing / C. Spearman // Amer. J. Psychol. — 1987. — Vol. 100. — P. 441–471.
11. Venger A. Molecular-genetic polymorphism of *vps* gene in Ukrainian hop varieties / A. Venger, N. Volkova // Modern science. — 2014. — Vol. 1. — P. 28–34.
12. Венгер А. М. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *chs2*, *chs3* та *chs4* у сортів хмеля звичайного української селекції / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // Вісник Запорізького національного університету. — 2015. — № 1 (29). — С. 13–21.
13. Венгер А. М. Поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, та його зв'язок з рівнем гірких речовин шишок хмелю звичайного / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // Наукові доповіді НУБіП України. — 2015. — № 2. — С. 1–9.
14. Венгер А. М. Визначення статі хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) за молекулярними маркерами / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // Зб. наук. праць СГІ–НЦНС. — 2013. — Вип. 26 (61). — С. 161–166.
15. Венгер А. М. Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // Мікробіологія і біотехнологія. — 2015. — № 1 (29). — С. 60–65.
16. Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетична оцінка сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) / Ю. М. Сиволап, Н. Е. Волкова, О. О. Захарова [та ін.] : метод. рек. — Одеса : КП ОМД, 2012. — 18 с.

Надійшла 04.06.2015.

UDC 633.791:575.113

**Venger A. M., Volkova N. E.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **MOLECULAR MARKERS IN HOP BREEDING (*Humulus lupulus* L.)**

Molecular genetic polymorphism of hop nuclear genome regions associated with secondary metabolites synthesis and sex, as well as microsatellite loci was analyzed. The dependence between polymorphisms of genes encoding chalcone synthase, and the content of bitter substances in hop cones was defined. The sets of molecular markers for hops genotype integrated assessment were developed, in particular for the authenticity determining, testing of sex, varieties type, registering.

УДК 633.791:575.113

**Венгер А. Н., Волкова Н. Э.**

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ И ПИТОМНИКОВОДСТВЕ  
ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*Humulus lupulus* L.)**

Проанализирован молекулярно-генетический полиморфизм участков ядерного генома хмеля, связанных с синтезом ценных вторичных метаболитов и проявлением пола, а также микросателлитных локусов. Определена зависимость между полиморфизмом генов, кодирующих халконсинтазы, и содержанием горьких веществ в шишках хмеля. Разработаны наборы молекулярных маркеров для комплексной оценки генотипа хмеля, в частности для установления автентичности, определения пола, типа сорта, регистрации.