

УДК 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

М. С. БАЛЬВІНСЬКА¹, к. б. н., ст. наук. співроб.,
Р. М. КАЛЕНДАР^{1,2}, доц., к. б. н., зав. лаб.,
І. А. БАЛАШОВА¹, к. б. н., пров. наук. співроб.,
О. Р. СТРАТУЛА¹, мол. наук. співроб.,
О. Ф. БРИК¹, к. б. н.,
О. О. ЗАХАРОВА¹, к. б. н.,
Ю. Ю. СУЛІМА¹,
О. В. БІЛИНСЬКА³, к. б. н., ст. наук. співроб., пров. наук. співроб.,
В. П. НЕЦВЕТАЄВ^{1,4}, д. б. н., проф., зав. лаб.

¹ СГІ–НЦНС, Одеса

balvinska@mail.ru

² РДП «Національний центр біотехнології», респ. Казахстан

ruslan.kalendar@mail.ru

³ Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, Харків

bilinska@ukr.net

⁴ Белгородський НДІ сільського господарства РАСГН

ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦІЙНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ ЯЧМЕНЮ (*Hordeum vulgare* L.) В СГІ–НЦНС

На основі ПЛР-аналізу молекулярно-генетичного поліморфізму різноманітних генотипів ячменю одержано ДНК-маркери для теоретичного і практичного використання. З залученням методів молекулярної генетики і геноміки проведено картування геному, диференціацію генотипів за ступенем їхньої спорідненості на внутрішньовидовому рівні, визначення однорідності генетичного матеріалу і детекцію алелів важливих генів ячменю, зокрема в-амілаз, типів і темпів розвитку, гордеїнів, вмісту амілоз. Показана можливість детекції потенційних ДНК-маркерів генів низькотемпературної чутливості, андрогенної здатності ячменю.

Ключові слова: ячмінь, молекулярно-генетичний поліморфізм, ПЛР, молекулярні маркери, картування геному, маркування генів.

Вступ. Ячмінь — економічно важлива культура в Україні і в світі, є вдалим модельним об'єктом для вивчення молекулярних, генетичних і фізіологічних особливостей злаків, зокрема *Triticeae*. В генетичному відношенні ячмінь — це самозапильний диплоїд. Генофонду цього цінного злаку властива значна генетична варіабельність [1, 2].

Наразі молекулярно-генетичні дослідження відносяться до пріоритетних напрямів розвитку теорії і практики селекції найважливіших видів рослин, зокрема ячменю. Значна кількість досліджень геному ячменю

заснована на результатах аналізу змін тих чи інших ділянок ДНК. Поліморфізм нуклеотидних послідовностей між окремими зразками може бути наслідком точкових мутацій, вставок, делецій або інверсій в ДНК-матриці [1]. В ефективності пізнання і розширення теоретичної бази, а також у можливості практичного застосування результатів найважливіша роль належить вибору відповідних методів та інструментів аналізу [2, 3].

До 1994 року основним методом одержання ДНК-маркерів геному ячменю слугував ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів, англ. — AFLP). Останніми двома десятиліттями найбільш ефективними для виявлення молекулярних маркерів є методи, засновані на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Широке застосування знайшли варіанти ампліфікації ДНК зі специфічними праймерами і праймерами довільної послідовності, за допомогою яких можна швидко виявити варіабельність певної кількості локусів геному рослини [1, 4, 5].

ДНК-маркери, які визначаються шляхом ПЛР-аналізу, можна розділити на кодомінантні, монолокусні, поліалельні і доміантні, полілокусні, біалельні [6]. Представниками монолокусної поліалельної кодомінантної системи маркерів є мікросателіти (SSRs). Завдяки своїм особливостям мікросателітні маркери набули найбільшого поширення в картуванні геномів, маркуванні локусів простих і кількісних ознак, ідентифікації і реєстрації сортів, зокрема ячменю, визначенні рівня гібридності, генетичної чистоти селекційного матеріалу та ін. Полілокусні системи (RAPD, ISSR, IRAP, REMAP та ін.) знайшли широке застосування у визначенні генетичних дистанцій, розподілі генотипів за рівнем генетичної спорідненості, визначенні ідентичності зразків, а також у маркуванні генів агрономічних ознак та ін., оскільки дозволяють дослідити значну кількість локусів одночасно [1, 5, 6]. Використання того чи іншого варіанту ПЛР-аналізу залежить від задачі дослідження. Зазвичай у вирішенні проблем селекційного поліпшення рослин, моно- і полілокусні маркерні системи доповнюють одне одного.

В Україні проведені численні дослідження, результат яких показує доцільність тих чи інших ПЛР-підходів у одержанні молекулярних маркерів геному ячменю, які можуть бути застосовані для вирішення як теоретичних питань, так і у селекційній практиці [6–15]. У цьому зв'язку дана робота є узагальненням аналізу поліморфізму ампліфікованої ДНК ячменю (*Hordeum vulgare* L.), що детектується шляхом різних ПЛР-методів для одержання ДНК-маркерів з метою побудови карт зчеплення, дослідження внутрішньовидових взаємовідносин представників виду *Hordeum vulgare* L., вивчення варіабельності та ідентифікації алелів генів цінних ознак, зокрема β -амілази (*Bmy1*), типів (*Vrn*) і темпів (*Ppd*) розвитку, гордеїнів (*Hrd*), вмісту амілози (*waxy*), низькотемпературної чутливості (*Dhn*, *Cbf*).

Матеріали і методи. Генетичним матеріалом дослідження слугували:

— представники виду *Hordeum vulgare* L.: 150 ліній самозапильної популяції № 106 (F_7 і F_8 , Одеський 1 15 x Гольф), що містили біохімічні мар-

кери ізоферментів (*Est 5*, *Bmy1*, *Est 1* і *Amy 1*), лінії отримані в СГІ–НЦНС, м. Одеса; 100 ліній дигаплоїдів Shiry x Galena, які відрізнялися стійкістю до *Puccinia hordey*, *Puccinia striiformis*, *Rhynchosporium secalis*, *BYDV* та 95 дигаплоїдів Oregon Wolfe Barley, OWB (вихідні форми — Dominant, Recessive — містили набір з 15 домінантних або відповідних рецесивних маркерних генів (*n/N*, *wx/Wx*, *lk/Lk-2*, *re2/Re2*, *v/V*, *wst/Wst*, *zeo/Zeo*, *al/Al*, *bt/Bt*, *pub/Pub*, *hs/Hs*, *κ/K*, *cer-yy/Cer-yy*, *o/O*, *s/S*, *r/R*) морфологічних ознак у гомозиготному стані і 93 лінії потомства, що містили різні комбінації маркерних генів батьків (люб'язно надані П. Хейсом, ун-т штату Орегон, США); батьківські форми (Харківський 67, Харківський 74, Екзотик, Фенікс) з різною здатністю до андрогенезу і цінними ознаками та дигаплоїди потомства (51 лінія) від схрещувань батьківських форм (надані к. б. н. О. В. Білинською, Ін-т рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, м. Харків); різні частини колекції сортів ярого та озимого ячменю давньої та сучасної селекції України, починаючи з 1931 р. (106 генотипів, зокрема 57 сортів ярого ячменю СГІ–НЦНС), матеріал наданий ЦГР, м. Харків, а також акад. А. А. Лінчевським, відділ селекції та насінництва ячменю СГІ–НЦНС, м. Одеса); колекція з 249 сортів ячменю, які районовані у різний час на території Східноєвропейської і Центральноазійської зон у межах колишнього СРСР (зібрана у ВІРі, люб'язно надана д. б. н. В. П. Нецветаєвим, д. б. н. О. О. Поморцевим); сорти іноземного походження, зокрема Джау Кабутак, Джау Сефадек, Betzes, Calsberg II, Тамми, Томмас, Іррі, Вавилон; сорти McGuire, Henley (відрізняються за локусами *Hrd A*, *Hrd B* і *Hrd C*) і гібриди потомства від McGuire x Henley (надані д. б. н. О. І. Рибалкою, відділ генетичних основ селекції СГІ–НЦНС);

— представники інших видів *Hordeum* L.: *H. spontaneum* C. Koch., *H. bulbosum* L., *H. murinum* L., *H. leporinum* L.

ДНК виділяли з етіольованих паростків або з ячмінної зернівки згідно з [4]. Детекцію молекулярно-генетичного поліморфізму досліджуваного генетичного матеріалу проводили шляхом різних варіантів ПЛР-аналізу (RAPD, ISSR, SSR, IRAP, REMAP, STS), використали термоциклери «Біотерм» (Росія) та «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Склад реакційної суміші, послідовності праймерів та умови ампліфікації в залежності від дослідження згідно з [4, 6, 7, 11, 13–23]. ПЛР-продукти розділяли методом електрофорезу в 2–4 %-му агарозному і 10 %-му денатуруючому поліакриламідному гелях в 1хTBE у залежності від ПЛР-методу [7, 11]. Для фрагмент-аналізу мікросателітних локусів ячменю (AWBMS56, UMB503, EBmac501, EBmac602, EBmac701, Bmac93, Bmac96, Bmac310, Bmag120, Bmag225, Bmag321, Bmag341) використали автоматизовану систему AlfExpress II («Amersham Biosciences», Швеція) з комп'ютерним програмним забезпеченням Fragment-analyser 1.03 [13].

Статистичний аналіз проміжних даних проводили за допомогою критерію χ^2 , t-критерію Ст'юдента та F-критерію Фішера [24]. Для SSR-локусів розраховували індекс поліморфності (PIC) [3, 11].

Комп'ютерний аналіз здійснювали за допомогою програм: *PCR* — для оптимізації умов відпалу RAPD-праймерів, *FastPCR* — для дизайну праймерів і оптимізації умов ПЛР; *TREE*, *MEGA* — для розрахунків генетичних дистанцій і кластерного аналізу методом *UPGMA* (*Unweighted-Pair-Group Method*); *MAPMAKER/EXP*, ver.3.0, *MAP_QTL* — для створення карт зчеплення [2, 4, 25], *Multain* - для вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів β -амілаз [2, 23], *ALFWin Software* — для проведення обчислень і документування даних фрагмент-аналізу мікросателітних локусів [13]. Біоінформативний аналіз проводили за алгоритмом *Blast* [2].

Результати дослідження та обговорення.

Аналіз внутрішньовидового поліморфізму ячменю (*H. vulgare L.*) Одним з напрямків використання молекулярно-генетичного поліморфізму є аналіз генетичного розмаїття видів, що дозволяє здійснювати розподіл і класифікацію генетичного матеріалу в залежності від рівня їхньої спорідненості [2].

З використанням найбільш доступних систем ДНК-маркерів на основі ПЛР, таких як RAPD, SSRP, IRAP і REMAP, оцінено рівень внутрішньовидового поліморфізму ячменю і показано генетичні зв'язки між представниками виду. Так, за допомогою ПП-ПЛР досліджено 19 сортів ярого ячменю, що походять з різних еколого-географічних зон. Застосуванням 9 інформативних RAPD-праймерів детектовано 156 ПЛР-локусів, з яких 61 виявився поліморфним. Рівень поліморфізму в середньому склав 39 % [7], що характерно і для інших злаків [4]. За аналізом 27 інших сортів ячменю з використанням IRAP- і REMAP-підходів детектовано поліморфізм 84 IRAP- і 105 REMAP-локусів, що в обох випадках достатньо для диференціації досліджених сортів [5]. Рівень поліморфізму за IRAP- і REMAP-аналізом, в середньому, був вищий, ніж за RAPD, що співвідноситься з даними інших авторів [2, 3]. З використанням різноманітного генетичного матеріалу (дигаплоїди, сорти) досліджено фракцію геному ячменю, що містить в основному динуклеотидні мікросателітні повтори. Рівень генетичної мінливості (індекс поліморфності, PIC) 20 досліджених мікросателітних локусів ячменю (HVM) варіював значною мірою і в середньому склав 0,41 [26].

Досліджені групи генотипів ячменю розподілено згідно з їх молекулярно-генетичними особливостями і генетичною подібністю. Так, 19 сортів ярого ячменю з різних еколого-географічних зон об'єдналися в 6 кластерів за походженням, формулою гордеїнів і територією районування [8]. Досліджені за допомогою IRAP- і REMAP-аналізів 27 сортів ячменю з колекції СГІ–НЦНС диференційовані на 2 кластери за такими ознаками, як ярові — озимі [6] (рис. 1).

За результатами кластеризації SSR-маркерів 32 сорти селекції СГІ сформували один великий кластер до якого окремою гілкою приєдналися дві дигаплоїдні лінії OWB [26]. У межах основного кластера найбільша віддаленість характерна для сортів, що створені на основі батьків

Гольф (популяції № 106) [7, 8] та двох популяцій дигаплоїдних ліній (Shiry x Galena і OWB (Oregon Woolf Barley) за допомогою різних ПЛР-підходів (RAPD, ISSR, SSRP) проведено картування геному ячменю [10, 11]. На основі одержаних ПЛР-маркерів, а також інших типів (ПДРФ, AFLP, ізоферментних, морфологічних) створено первинні карти досліджених популяцій, основні параметри яких наведено в таблиці 1.

Так, за даними ПЛР- і генетичного аналізів 150 ліній популяції № 106 ідентифіковано 25 варіабельних локусів (4 ізоферменти та 21 RAPD), з яких 21 (2 ізоферменти та 19 RAPD) утворили 6 груп зчеплення [8]. Карта, яка побудована на основі аналізу дигаплоїдів Shiry x Galena, що відрізнялись стійкістю до ряду захворювань, включає 107 маркерних локусів, з яких 33 RAPD увійшли до 7 груп зчеплення [10]. З комплексним ПЛР-підходом (RAPD, ISSR, SSR) детектовано 81 поліморфний ПЛР-локус в модельній популяції множинно маркованих дигаплоїдних ліній ярого ячменю OWB (Oregon Woolf Barley), з яких 36 утворили 7 груп зчеплення і ототоженні з конкретними хромосомами ячменю [11]. Мінімальна відстань між тісно зчепленими маркерами на одержаних картах складала від 1,0 сМ (для популяції № 106 і дигаплоїдів Shiry x Galena) до 4,3 сМ (для дигаплоїдів OWB).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика первинних карт зчеплення досліджуваного матеріалу

Генетичний матеріал	N1 ¹	N2 ²	Різноманіття і кількість зчеплених маркерів								N3 ³	Покриття карти, сМ	
			всього	RAPD	SSR	ISSR	RFLP	AFLP	ізозимів	морфологічних			
Популяція № 106	150	21	21	19	–	–	–	–	–	2	–	6	237
Дигаплоїди Shiry x Galena	100	99	107	33	1	–	14	56	1	1	7	1047,3	
Дигаплоїди OWB	95	81	51	22	3	11	–	–	–	15	7	926,4	

Примітки: ¹ — кількість досліджених генотипів; ² — кількість детектованих поліморфних ПЛР-локусів; ³ — кількість утворених груп зчеплення.

Покриття карт популяції № 106, дигаплоїдів OWB і Shiry x Galena складає відповідно 19,0, 74,1 і 83,3 % від загального розміру геному, якщо вважати його рівним 1250 сМ [7, 10, 11].

За аналізом зчеплення маркерів з залученням популяції № 106 ідентифіковано RAPD-фрагмент Р6_900 п. н., який виявився тісно зчепленим

(1,0 сМ) з геном *Vmy1* [9]. Особливості гомозиготного дигаплоїдного матеріалу OWB дозволили ідентифікувати ПЛР-фрагменти, які тісно зчеплені з алелями маркерних генів морфологічних ознак на хромосомах 3, 6, 7 відповідно: P89_522 п. н. — *A1* (4,3 сМ), HVM74_192 п. н. — *O* (4,3 сМ), ORS1a_390 — *S* (4,4 сМ) [11]. Морфологічні ознаки, що корелюють з виявленими ПЛР-фрагментами або їхнім альтернативним проявом, мають таксономічне значення, деякі з них використовуються для опису культурних сортів ячменю.

Покритий виявленими ДНК-маркерами розмір геному є достатнім для визначення зчеплення з *QTLs* [27]. За аналізом зчеплення маркерних ПЛР-локусів популяції № 106 ідентифіковані RAPD-маркери, які виявлятимуть достовірну різницю між кількісними показниками низки агрономічних ознак (маса 1000 зерен, кущистість, озерненість, продуктивність, кількість зерен з рослини) і можуть бути залучені до аналізу селекційно-генетичного матеріалу. За результатами дослідження виявлено, що для посушливих зон можуть бути рекомендовані генотипи, які мають такий набір ПЛР-маркерів: P63_700 п. н., P57_1000 п. н., P9_680 п. н., P66_2320 п. н., P52_700 п. н., P6_0 (900) п. н., P2_604 п. н., а для зон з достатнім зволоженням — P39_1188 п. н., P39_2300 п. н., P69_1050 п. н., P52_700 п. н., P44_560 п. н., P2_1300 п. н., P57_1000 п. н., P2_604 п. н. Маркери досліджених локусів кількісних ознак ідентифіковані в 3, 4 та 6 групах зчеплення [7, 8].

Отже, використання ПЛР-аналізу та спеціально створеного генетичного матеріалу дозволило одержати ДНК-маркери та визначити їхню хромосомну локалізацію шляхом виявлення зчеплення між ними і маркерами генів біологічно цінних ознак, що може бути використано в подальших теоретичних дослідженнях і практиці. Показана перспективність аналізу з використанням генетично однорідних дигаплоїдних ліній.

Вивчення поліморфізму і маркування генів господарсько цінних ознак ячменю. Наразі технологія ДНК-аналізу надає можливість досліджувати організацію та поліморфізм генів важливих ознак ячменю на молекулярному рівні та проводити активний пошук молекулярних маркерів цих генів. У результаті ПЛР-аналізу з праймерами, які розроблені нами на основі послідовностей генів гордеїнів, виявлено здатність детектувати поліморфізм гордеїнкодуєчих локусів між батьківськими сортами McGuire, Henley, які відрізняються за локусами *Hrd A*, *Hrd B* і *Hrd C*, а також виявляти гібридні генотипи в потомстві F_2 [28]. Показано, що детектований поліморфізм пов'язаний з локусом *Hrd B* і може бути використаний у подальшому для аналізу сортів ячменю.

Досліджено наявність інерційно-делеційного поліморфізму 30 сортів ярого і озимого ячменю української селекції за локусом *waxy*, що контролює вміст амілози. У більшості проаналізованих сортів ярого ячменю і у всіх озимих зустрічався алель 800 п. н., що відповідає, як і очікувалось, домінантному алелю *Waxy* і генотипу з нормальним вмістом

амілози. Цікавим є факт, що у низки сортів ярого ячменю (Адапт, Донецький 650 та ін.), переважно сучасної селекції, детектований алель *new-Waxy* — 1000 п. н., а також обидва алелі 800/1000 п. н. (Одеський 9) у різному співвідношенні (20–80 %). До появи алеля *new-Waxy* (1000 п. н.) призводить інсерція 193 п. н. в інтроні I гена *GBSS I*, яка, як відомо, фенотипово не виявляється і не впливає на якість ознаки [18], але це докладно не досліджено. Алель 600 п. н. (делеція 403 п. н.), який відповідає за восковидний ендосперм (*waxy*), у даному генетичному матеріалі не знайдено. Маркерні алелі *waxy*-локусу можуть бути використані для аналізу гібридних форм ячменю (*waxy/Waxy*) і селекції сортів на низький вміст амілози [13].

Відомо, що алельний поліморфізм гена *Bmy1* зумовлений інерцією MITE (Miniature inverted-repeat transposable element) 126 п. н. (Stowaway-транспозон) у третьому інтроні гена *Bmy1*, яка призводить до пригнічення активності ферменту β-амілази [16]. З використанням інтрон III-специфічного маркера алелів гена *Bmy1* показано, що серед досліджених 106 сортів ярого ячменю давньої і сучасної селекції України, які зареєстровані як пивоварні, більшість мають алель активної β-амілази 516 п. н., а зернові — несуть мутантний алель 643 п. н., з інсерцією, що відповідає наявності низькоактивної β-амілази [29]. Деякі ярі сорти, як пивоварні, так і зернові, є гетерогенними за даним локусом і містять обидва алелі в різному співвідношенні. У всіх озимих сортів, що є, до речі, цілком генетично однорідними за цим локусом, і невеликої кількості ярих пивоварних сортів детектований алель 643 п. н. Серед проаналізованих інших видів ячменю різного географічного походження у дикуна *H. spontaneum* PI 296897 з ізраїльської провінції Іудея підтверджено наявність алеля високоактивної β-амілази 477 п. н.

Сучасні досліджувані ресурси дозволяють перейти до визначення мінливості ознак на основі нових технологій функціональної геноміки. За результатами секвенування і біоінформатичного аналізу нами сконструйовані алель-специфічні праймери, що походять з консервативних білоккодуєчих ділянок генів β-амілаз *Bmy1* і *Bmy2* ячменю. EPIC-праймери (від англ. EPIC — exon-primed intron-crossing) [30] генерують появу відповідних продуктів ампліфікації ДНК локусу *Bmy1* у ячменю (3152 п. н. — без вставки, 3278 п. н. з інсерцією 126 п. н. і, передбачено, 3113 п. н.) та представників *Poaeseae*, а також ПЛР-продуктів локусу *Bmy2* (2260 п. н.) [23]. За допомогою інтрон-III-специфічного маркера і EPIC-маркерів ідентифікували генотипи ячменю — носії алелів, що зумовлюють різну активність ферменту β-амілази сортів колекції, що районовані у різний час на території колишнього СРСР [23, 31]. Загалом, найбільшого розповсюдження набув алель активної β-амілази, частка якого склала 69 % (рис. 2, а).

За дослідженням географічного поширення алелів гена *Bmy 1* ячменю [23, 31] визначена суттєва перевага алеля активної β-амілази в північних

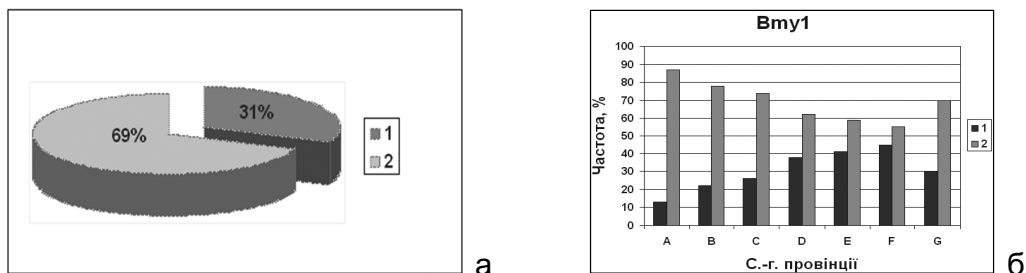


Рис. 2. Розповсюдженість і співвідношення алелів β -амілазного локусу *Vmy1*: а — загальне; б — частота на території сільськогосподарських провінцій (А — Європейська, В — Прибалтійська, С — Білоруська, D — Середньоросійська, Е — Західносибірська, F — Далекосхідно-Усурійська, G — Передалтайська) у межах колишнього СРСР; 1 — алель з інсерцією 126 п. н.; 2 — алель активної β -амілази

регіонах (рис. 2, б), що співпадає з сучасними даними про кліматичні умови Північно-європейської частини, як бажаними для вирощування пивоварних сортів. З просуванням на південь збільшується частота алеля низькоактивної β -амілази.

З метою визначення оптимального розвитку сортів у певних кліматичних регіонах і ефективної селекції високоврожайних генотипів актуальним є одержання ДНК-маркерів генів яровизації та фотоперіоду ячменю, а також стійкості до несприятливих умов вирощування [14].

Показано можливість встановлення алельного стану трьох генів *Vrn* і *ppd-H1* у озимих сортів і дворучок шляхом ПЛР-аналізу зі специфічними праймерами, що генерують ПЛР-фрагменти певного розміру, які відповідають наявності домінантного або рецесивного алелів [18–20]. Нуль-алель зумовлює відповідний альтернативний варіант. Так, у всіх досліджених 14 сортів озимого ячменю і 6 дворучок з використанням специфічних праймерів до регуляторного елемента HvVM5 в інtronі I гена *Vrn-H1* виявлено ПЛР-фрагмент 1500 п. н., що відповідає рецесивному алелю. За ПЛР-аналізом локусу *Vrn-H2* в 12 з 14 досліджених озимих сортів детектований ПЛР-фрагмент 208 п. н., який відповідає домінантному алелю *Vrn-H2*. Сорти Кондрат та Майстер, а також 6 сортів-дворучок мали нуль-алель, що свідчить про наявність у них альтернативного алеля (*vrn-H2*). У всіх досліджених сортів, і озимих і дворучок, за ПЛР-аналізом визначено ПЛР-фрагмент 770 п. н., який відповідає рецесивному алелю *vrn-H3*, що підтверджує їхню приналежність до відповідного типу розвитку [12, 19]. Щодо результатів ПЛР-аналізу локусу *Ppd-H 1* — у двох (Наоміе, Вінмалът) з 14 досліджених сортів озимого ячменю детектований ПЛР-фрагмент розміром 1012 п. н., що відповідає домінантному алелю і є виключенням. Інші озимі сорти, а також дворучки мали нуль-алель за даним локусом.

Отже, ПЛР-аналізом підтверджено приналежність низки сортів (Трембіта, Сармат, Михайло, Добриня, Майбрит, Зимовий, Трудівник,

Буревій, Академічний, Селена Стар) до істинно озимих з типовою комбінацією алелів: *vrn-H1Vrn-H2vrn-H3*, до дворучок з типовою комбінацією рецесивних алелів *vrn-H1vrn-H2vrn-H3* (Росава, Основа, Достойний, Абориген, Снігова королева, Дев'ятий вал), а також виявлені генотипи, які мали нетипові, домінантні алелі *Vrn-H2* та *Ppd-H1*.

Згідно з літературними даними, ідентифіковано низку генів холодостресу, які індукуються у відповідь на низькотемпературний стрес, досліджено їхній вплив на рівень низькотемпературної стійкості [32, 33].

При використанні комбінованих праймерів до ділянок перших екзонів генів *Dhn 4* і *Dhn 7*, що містять мутації [22], можуть генеруватися такі ПЛР-фрагменти: у озимих — 204 п. н., 210 п. н. і у ярих — 198 п. н., 240 п. н. За результатами ПЛР-аналізу 30 досліджених генотипів з даними праймерами, у сімнадцяти з яких 15 ярих і 2 озимих, виявлено ПЛР-фрагменти 198 п. н. і 240 п. н., тринадцять інших озимих мали ПЛР-фрагменти 204 п. н. та 210 п. н. Нетипову картину детектовано для двох озимих сортів (Ігри і Вавілон), що засвідчує наявність ПЛР-фрагментів, характерних для групи ярих генотипів. Такі відмінності, імовірно, потенційно можуть виявитися у будь-яких інших озимих генотипів або дворучок, що може впливати на їхню чутливість до низької температури. Щодо ярих — поліморфізм досліджених ділянок і мутаційні зміни у вивчених ділянках ДНК даної вибірки сортів не виявлено.

ПЛР-аналіз з парою праймерів на основі сиквенсів гена *Dhn5* показав ДНК-поліморфізм у низки ярих та озимих сортів ячменю. Виявлено кілька алельних варіантів: 190 п. н. і 210 п. н. Так, для озимих сортів характерним був ПЛР-фрагмент розміром 210 п. н. Серед 30 проаналізованих ярих сортів у більшості детектовано ПЛР-фрагмент 190 п. н., і у незначній частині — 210 п. н., як у озимих. Деякі ярі сорти були гетерогенними за даним локусом і мали обидва ПЛР-фрагменти. Такий розподіл, можливо, вказує на наявність у сортів ярого ячменю генетичного потенціалу (алель 210 п. н.) підвищеної толерантності до дії абіотичних чинників, зокрема низьких температур. Однак прямої залежності між наявністю певного алеля і ознакою стійкості до певного абіотичного фактора поки що не встановлено.

Згідно з літературними даними [21], ПЛР-аналізом детектований поліморфізм ділянок ДНК низки генів, зокрема, *pAF93*, *Blt 14*, *Blt 4.9*, *Cor14b*, *pAO986*, які індукуються у відповідь на низькотемпературний стрес, що визначається наявністю у генотипів ПЛР-фрагментів певного розміру або нуль-алелем за кожним з цих локусів. За результатами ПЛР-аналізу 30 сортів ярого та озимого ячменю української селекції у чотирьох досліджених генотипів спостерігається внутрішньосортова гетерогенність за локусами *Blt 4.9*, *Blt 14*, а також різниця в алельному стані за локусом *Blt 4.9*. Для сортів Галактик і Соборний нуль-алель виявлено у 10 % досліджених зразків ДНК, для сортів Одеський 9, Донецький 650 — у 20 %. Наявність нуль-алелю пов'язана з мутаціями у сайтах праймування, які,

імовірно, можуть мати функціональне значення. Шляхом ПЛР-аналізу дослідженого генетичного матеріалу виявлено відсутність таких мутацій у локусах *pAF 93*, *Cor14b*, *pAO986*, що, згідно з літературними джерелами, виявляються у генеруванні ПЛР-фрагментів певного розміру [21].

Cbf-гени ячменю розміщені в 5HL хромосомі, в зоні, близькій до гена *Fr-H2*, і контролюють відповідь на стресові умови, пов'язані з впливом холоду, а також морозостійкість, чутливість до яровизації, акліматизацію тощо [32, 15]. Одним з цільових генів чинника транскрипції *CBF2* є ген ячменю *Hva1*, що активується у відповідь організму на стрес і запускає «холодовий шлях». Секвенування та аналіз секвенованого фрагмента дозволив нам виявити послідовність ДНК, яка є ідентичною *cis*-активному елементу гена *Hva1* ячменю [15]. ПЛР-аналізом зі спрямованими праймерами до гена *Cbf2*, а також гена *Hva1* детектовано поліморфізм між генотипами ячменю, які є контрастними за низькотемпературною толерантністю [15, 16]. Профілі STS-ПЛР показують, що у ярих сортів, на відміну від озимих та дворучок, за локусом *Cbf2* детектуються поліморфні фрагменти розміром 450 п. н. та 50 п. н. відповідно. За локусом *Hva1* у озимих і дворучок детектований амплікон в ділянці 480 п. н., який відсутній у ярих сортів, що зумовлено, ймовірно, змінами у сайті праймування на матриці ДНК. Наявність зазначених фрагментів у спектрах ампліфікації ДНК ячменю дозволяє ідентифікувати генотипи ярого або озимого ячменю та дворучок у загальній вибірці. Передбачається, що виявлені поліморфні локуси ДНК зумовлені присутністю досліджених генів у різному алельному стані у генотипів з різною низькотемпературною стійкістю [14].

Отже, наразі вивчення низькотемпературної толерантності спрямоване, в основному, на ідентифікацію стресових генів, виявлення особливостей їхньої організації та функціональної важливості, значно меншою мірою — для підвищення ефективності аналізу селекційного матеріалу.

Значної уваги заслуговує вивчення генетичного контролю здатності до культури *in vitro* і виділення форм серед генотипів вітчизняного ячменю, що поєднують високу андрогенну здатність з комплексом цінних ознак [34]. Проведено тестування дигаплоїдів батьківських форм Екзотик, Харківський 74, Фенікс, Харківський 67 з різною здатністю до андрогенезу і ліній потомства, які отримані від схрещувань вищезазначених генотипів з використанням мікросателітного маркера *HVM 36* [35], що асоційований з андрогенною здатністю. Показано, що значна частина дигаплоїдів потомства успадкувала переважно алелі, що походять від генотипів з високою андрогенною здатністю, зокрема 84 % ліній ДГ-популяції мали алель 116 п. н. сорту Екзотик, у тому числі лінія ДГ00–126 з трансгресивним успадкуванням за кількістю морфогенних пиляків і частотою регенерації. Це співвідноситься з оцінкою мінливості ДГ-ліній у порівнянні з батьківськими формами гібридів щодо відхилення за частотою індукції морфогенних структур (калюсу, ембріоїдів) і рослин-регенерантів у бік

батьківського сорту з більш високою андрогенною здатністю. Але це не є достатнім для пояснення трансгресивного успадкування, особливо за здатністю до регенерації зелених рослин [34].

Отже, можна виявити певні окремі алелі дослідженого МС-локусу, які найбільш типові для генотипів з високим рівнем андрогенної здатності, що, згодом, є потенційними маркерами системи детекції здатності до культури *in vitro* різних генотипів ячменю.

Висновки. Продемонстровано праймер-специфічність ділянок гібридизації та різний рівень внутрішньовидової специфічності зразків ампліфікованої ДНК ячменю, що визначено з використанням різноманітних ПЛР-підходів. Розроблено ДНК-маркери для внутрішньовидової диференціації і класифікації генотипів. При використанні моно- і полілокусних систем ПЛР-маркерів досліджені генотипи можуть бути сгруповані за схожістю ознак, зокрема такими, як походження, територія районування, формула гордеїнів, яровість–озимість. Картовано локуси поліморфних ПЛР-продуктів, визначено їх зчеплення з біохімічними і морфологічними маркерами. При створенні первинних карт для визначення зчеплення молекулярних маркерів з іншими маркерами та ототожнення їх з хромосомами показана можливість ефективного використання як дигаплоїдів, так і самозапильних ліній. Для одержання ефективних маркерів полігенних ознак необхідним є аналіз рослин однієї комбінації в різних еколого-географічних зонах. На основі біоінформатичних методів, секвенування і ПЛР-аналізу розроблена система детекції алелів гена *Vmu1* ячменю та інших представників *Poaceae*, детектовано алельний поліморфізм гордеїнокодуючих локусів (*Hrd B*), *waxy*, *Dhn*, визначено алельний стан генів *Vrn* і *Ppd-H1*, а також різницю в алельному стані генів *Cbf*, *Hva1* у контрастних за низькотемпературною чутливістю генотипів. Показано можливість виявлення потенційних ДНК-маркерів, зокрема андрогенної здатності ячменю, на основі мікросателітів. Одержані ДНК-маркери можуть бути використані для подальших теоретичних досліджень та аналізу селекційного матеріалу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Календарь Р. Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р. Н. Календарь, В. И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. — 2002. — Т. 34, № 4. — С. 279–295.
2. Сиволап Ю. М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Календарь. — Одесса : Астропринт, 2011. — 336 с.
3. Agarwal M. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences / M. Agarwal, N. Shrivastava, H. Padh // Plant Cell Reports. — 2008. — Vol. 27. — P. 617–631.
4. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : науч.-метод. рук-во / [под ред. Ю. М. Сиволапа]. — К. : Аграрна наука, 1998. — 156 с.

5. IRAP и REMAP-анализ сортов ячменя Одесской селекции / А. Ф. Брик, Р. Н. Календарь, О. Р. Стратула, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2006. — № 3. — С. 24–33.
6. Varshney R. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications / R. Varshney, A. Graner, M. E. Sorrells // Trends Biotechnology. — 2005. — Vol. 23. — P. 48–55.
7. Календарь Р. М. Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму геному ячменю (*Hordeum vulgare* L.) методом полімеразної ланцюгової реакції [Текст] : дис. ... к. б. н. / Р. М. Календарь. — Київ, 1996. — 26 с.
8. Сиволап Ю. М. Использование продуктов полимеразной цепной реакции для картирования генома ячменя (*Hordeum vulgare*) / Ю. М. Сиволап, Р. Н. Календарь, В. П. Нецветаев // Генетика, 1997. — Т. 33, № 1. — С. 43–49.
9. Маркерный анализ некоторых QTL ячменя с помощью RAPD и изоферментов / Ю. М. Сиволап, Р. Н. Календарь, В. П. Нецветаев, А. Е. Чапля // Цитология и генетика. — 1997. — Т. 31, № 4. — С. 39–44.
10. Сулима Ю. Ю. Картирование генома ячменя RAPD-анализом с использованием дигаплоидных линий / Ю. Ю. Сулима, Р. Н. Календарь, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 41–49.
11. Бальвінська М. С. ПЛР-аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму ячменю (*Hordeum vulgare* L.) [Текст] : дис. ... к. б. н. / Бальвінська Марина Сергіївна. — Київ, 2002.
12. Молекулярні маркери у розвитку теорії і практики селекції ячменю : науково-методичний посібник / Ю. М. Сиволап, М. С. Бальвінська, О. О. Захарова, Р. М. Календарь, О. Р. Стратула. — Одеса : Астропринт, 2014. — 88 с.
13. Бальвінська М. С. Використання фрагмент-аналізу для ДНК-типівання сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.) : методичні рекомендації / М. С. Бальвінська, І. Л. Холявіцька, Ю. М. Сиволап. — Одеса, 2010. — 18 с.
14. Использование ПЦР-анализа для маркирования генов семейства *Cbf*, контролирующих низкотемпературную акклиматизацию у ячменя и мягкой пшеницы / И. А. Балашова, М. С. Бальвинская, В. И. Файт, М. В. Галаева, Ю. М. Сиволап // Биополимеры и клетка. — 2008. — Т. 24, № 2. — С. 129–134.
15. Спосіб диференціації і ідентифікації ярого та озимого ячменю : деклар. пат. № 69102. Україна / Бальвінська М. С., Балашова І. А., Сиволап Ю. М. // Бюл. ВАК України. — 2012. — № 8. — 4 с.
16. Erkkila M. Allele-dependent barley grain β -amylase activity / M. Erkkila, R. Leah, H. Ahokas [et al.] // Plant Physiol. — 1998. — № 117. — P. 679–685.
17. Domon E. The insertion/deletion polymorphisms in the *waxy* gene of barley genetic resources from East Asia / E. Domon, M. Fujita, N. Ishikawa // Theor Appl Genet. — 2002. — Vol. 104. — P. 132–138.
18. Dubcovsky J. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley / J. Dubcovsky, C. Chen, L. Yan // Mol. Breed. — 2005. — Vol. 15. — P. 395–407.
19. Nowak M. Identyfikacja genów *Vrn* (*Hordeum vulgare* L.) / M. Nowak // Biuletyn instytut uhodowlii aklimatyzacji roślin. — 2009. — Vol. 252. — P. 179–185.
20. Lister D. L. Latitudinal variation in a photoperiod response gene in European barley: insight into the dynamics of agricultural spread from 'historic' specimens / D. L. Lister, S. Thawc, M. A. Bower, H. Jones // Journal of Archaeological Science. — 2009. — Vol. 36. — P. 1092–1098.

21. Haliloglu K. The novel approach towards estimation of frost tolerance in barley / K. Haliloglu, M. Tosun, T. Yildirim, M. Ayidin // *Biotechnol. & Biotechnol. eq.* — 2009. — Vol. 23, № 1. — P. 1131–1135.
22. Holkova L. Allelic Variations at *Dhn4* and *Dhn7* are Associated with Frost Tolerance in Barley / L. Holkova, P. Mikulkova, P. Hrstkova, I. T. Prášil [et al.] // *Czech J. Genet. Plant Breed.* — 2010. — Vol. 46, № 4. — P. 149–158.
23. Стратула О. Р. Аллельные варианты гена *Vmy1* ячменя в восточноевропейской и центральноазиатской зонах / О. Р. Стратула, Р. Н. Календарь, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика.* — 2015. — Т. 49, № 2. — С. 11–15.
24. Лакин Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин — М. : Высш. шк., 1990. — 352 с.
25. Sneath P. H. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification / P. H. Sneath, R. R. Socal — San Francisco: W. H. Freeman, 1973.
26. Бальвинская М. С. SSRP-анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортов ярового ячменя Южно-украинской селекции / М. С. Бальвинская, М. Reder, Ю. М. Сиволап // *Доклады РАСХН.* — 2001. — № 5. — С. 3–7. Фах. вид. ВАКУ.
27. Kleinhofs A. A Molecular, Isozyme, and Morphological Map of the Barley Genome (*Hordeum vulgare*) / A. Kleinhofs, A. Kilian, M. Saghai Maroof, R. M. Biyashev [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 1993. — Vol. 86. — P. 705–712.
28. Детекція господарсько цінних ознак насіння ячменю за ДНК-маркерами / М. С. Бальвінська, Р. М. Календар, О. Р. Стратула, І. В. Ланцман, Ю. М. Сиволап // зб. наук. праць «Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні». — Одеса, 2008. — С. 48–51.
29. Стратула О. Р. Аллельные характеристики гена β -амилазы сортов ячменя Украины / О. Р. Стратула, Ю. М. Сиволап // *Цитология и генетика.* — 2007. — № 4. — С. 20–25.
30. Li C. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes / C. Li, J. M. Riethoven, L. Ma // *BMC Evolutionary Biology.* — 2010. — Vol 10. — P. 90.
31. Использование ДНК-маркеров для характеристики сортов и оценки агрономически важных признаков ячменя / М. С. Бальвинская, И. Л. Холявицкая, О. Р. Стратула, И. А. Балашова, Ю. М. Сиволап // сб. науч. тр. по мат. Всеукраинской науч. конф. «Украинская научная мысль. Выпуск 1». — Киев, 2011. — С. 44–46.
32. Structural, functional, and phylogenetic characterization of large CBF gene family in barley / J. S. Skinner, J. Zitzewitz, L. Marquez-Cedillo, T. Filichkin [et al.] // *Plant Mol. Biol.* — 2005. — V.59. — P.533–551.
33. Busconi M. The cold-regulated genes are involved in the physiological response of barley to cold environment / M. Busconi, Chr. Dal Bosco, Cr. Crosatti, P. Baldi [et al.] // *Buvisindi Icel Arg Sci.* — 2001. — Vol. 14. — P.17–27.
34. ДГ00–126 — модельний генотип для досліджень у галузі експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю ярого (*H. vulgare* L.) // Генетичні ресурси рослин для стабільного задоволення різноманітних потреб людей : матеріали Міжнародної наукової конференції. — Харків, 26–27 вересня 2012. — С.79.
35. Manninen O. M. Association between anther culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.) [Text] / O. M. Manninen // *TAG.* — 2000. — Vol. 100. — P. 57– 62.

UDC 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

Balvinska M. S., Kalendar R. M., Balashova I. A., Stratula O. R., Bryk O. F., Zakharova O. O., Sulima Yu. Yu., Bilinska O. V., Netsvetayev V. P. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

DNA TECHNOLOGY IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) GENETIC AND BREEDING RESEARCH SUMMARY AT PBGI–NCSCI

Based on PCR-analysis of molecular and genetic polymorphisms of different barley genotypes DNA markers were obtained for the theoretical and practical applying. With the involvement of molecular genetics and genomics methods was conducted mapping of the genome, genotype differentiation in the degree of genetic relationship to intraspecies level, determination of genetic homogeneity and detection alleles of important barley gene, including b-amylase, development of types and rates, hordeins, content of amylose, resistance to low temperature, androgonic capacity of barley.

УДК 577.2:631[633.111:664.64.016.8]

Бальвинская М. С., Календарь Р. Н., Балашова И. А., Стратула О. Р., Брик А. Ф., Захарова О. А., Сулима Ю. Ю., Белинская Е. В., Нецветаев В. П.

ДНК-ТЕХНОЛОГИИ В ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.) В СГИ–НЦСС

На основе ПЦР-анализа молекулярно-генетического полиморфизма различных генотипов ячменя получены ДНК-маркеры для теоретического и практического использования. С привлечением методов молекулярной генетики и геномики проведено картирование генома ячменя, дифференциация генотипов по степени генетического родства на внутривидовом уровне, определение однородности генетического материала и детекция аллелей важных генов, в частности, в-амилаз, типов и темпов развития, гордеинов, содержания амилозы. Показана возможность выявления потенциальных ДНК-маркеров генов низкотемпературной чувствительности, андрогенной способности ячменя.