

І. П. Штанько,
кандидат сільськогосподарських наук

В. Б. Ковальов,
доктор сільськогосподарських наук

Б. Ф. Кормільцев,
кандидат біологічних наук

*Інститут сільського господарства
Полісся НААН*

стабільності геному сортів хмелю селекції ІСІП за умов тривалого періоду багаторазового пасажування та зберігання експлантів у колекції в умовах *in vitro*. *Матеріали та методи досліджень.* Матеріалами для дослідження слугували рослини сортів хмелю Кумир, Альта, Заграва та Славянка (вихідні рослини колекції генофонду *in vivo*, зразки колекції *in vitro*). Виділення ДНК, мацерацію та інші технологічні процеси проводили за загальноприйнятими біотехнологічними методиками. Визначення ДНК проводили за допомогою горизонтального електрофорезу на агарозному гелі в генному ампліфікаторі GeneAmp PCR9700. Візуалізацію бендів ДНК отримували за допомогою системи документування і аналізу гелів GelVue UV Transilluminator (компанії SAE-PLAS). *Результати.* Застосування панелі з 12 праймерів для ДНК-ідентифікації рослин різного терміну культивування показало відсутність молекулярно-генетичних змін експлантів хмелю. Встановлено, що спектри ампліфікованої ДНК експлантів, які культивувались *in vitro* протягом шести місяців, одного та двох років не відрізняються від спектрів ДНК сортів на початку мікроклонального культивування та вихідних рослин. *Висновки.* Дослідження вказують на стабільність ДНК сортів хмелю, за тривалого культивування *in vitro* та підтверджують можливість контролю молекулярно-генетичної ідентифікації сортів на різних етапах розвитку.

Ключові слова: мінливість, геном, ПЛР-аналіз, культура *in vitro*.

Висвітлення стану проблеми. Одним із актуальних завдань біотехнологічних досліджень є збереження генетичного різноманіття культурних рослин в колекціях *in vitro*, що пов'язано з можливостями їх зберігання в контрольованих умовах середовища, з компактністю колекцій, можливостями масового і прискореного розмноження незалежно від пори року [1, 2]. Нині методи збереження колекцій *in vitro* потребують детальної розробки, оскільки фактично відсутні методи моніторингу життєздатності мікророслин, недостатньо розроблені методи оцінки генетичної стабільності *in vitro* рослин, не визначені строки збереження в культурі без пересаджування, зокрема і для хмелю звичайного.

Існує декілька способів зберігання *in vitro*, одним з яких є депонування пробіркових рослин в умовах низьких позитивних температур. Оскільки такі умови зберігання *in vitro* можуть виступати для рослин як стресовий фактор, передбачається, що це може викликати включення в рослинному організмі системи реакцій відповіді на стрес з

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМУ СОРТІВ ХМЕЛЮ В УМОВАХ ТРИВАЛОГО КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO*

Вступ. Результати досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму геному хмелю та розроблені на їх основі ДНК-маркери успішно використовуються для хмелю при ідентифікації сортів, контролю автентичності та генетичної чистоти сортів, визначення генетичної стабільності, генетичного картування тощо. Особливої уваги заслуговують питання молекулярно-генетичної мінливості сортів хмелю за тривалого їх субкультивування у культурі *in vitro* в умовах біотехнологічних колекцій, що є важливим для уточнення технологічних підходів до збереження сортової чистоти генотипів. *Мета і завдання.* Визначення

утворенням в клітинах активних форм оксигену, а їх накопичення може призвести до пошкодження макромолекул, в тому числі і до порушень ДНК. При багаторазовому пасажуванні експлантів у деяких рослин можлива поява відхилень стабільності геному від норми з появою мутацій у потомстві регенерованих рослин. Це явище, яке називається соматоклональною мінливістю, може бути визначене як генетична мінливість, яка нагромаджується у процесі штучного культивування тканин. Генетична мінливість, викликана мутаціями, успадковується не тільки в ряді клітинних поколінь, але і в потомстві регенерантів, у зв'язку з чим цей тип мінливості має найбільше значення для селекції, оскільки саме він дозволяє створювати нові генотипи [3].

Тому обов'язковою умовою мікроклонального розмноження рослин є використання об'єктів, які повністю оберігають генетичну стабільність на усіх етапах процесу від експлантів до рослин у полі. Для хмелю звичайного ці умови переважно задовольняє використання апексів і пазушних бруньок [2, 4,

5]. У розсадництві хмелю, за умов масового виробництва садивного матеріалу методом *in vitro* та тривалого періоду багаторазового пасажування чи зберігання експлантів у колекції *in vitro*, моніторинг сортової чистоти є найбільш актуальною проблемою, яка потребує наукового вирішення.

Нині в Україні використовують методи ідентифікації генотипів хмелю за морфологічними, біохімічними та господарськими ознаками [6-8]. Але вони мають ряд недоліків. Показники фенотипових ознак (форма куща, шишки, індекс щільності шишки, кількість лупулінових зерен та інші) в першу чергу залежать від фаз розвитку рослини та її віку. На біохімічні та господарські показники впливають цілий ряд екологічних (кліматичні умови, ґрунтовий покрив, регіон вирощування) та агрохімічних (культура землеробства, умови живлення, строки збирання, ступінь пошкодження хворобами) чинників. Ідентифікація сортів хмелю такими методами потребує тривалого часу — від кількох місяців до декількох років. При цьому визначити належність саджанців за допомогою цих методів практично неможливо. Провести сортову ідентифікацію садивного матеріалу хмелю на етапах розмноження можливо лише за допомогою молекулярно-генетичного методу на основі ПЛР-аналізу [9-11]. Успішне застосування ДНК-ідентифікації на багатьох культурах дало можливість проводити визначення рівня їх генетичної спорідненості, реєстрацію генотипів, створити бази даних за ДНК-типуюванням тощо. Результати цих досліджень широко використовуються як в розсадництві, так і в селекції сільськогосподарських культур.

Постановка проблеми. Дослідження, які проводились у Чехії, Німеччині, США, Словенії, Японії та в Україні (НУБіП, СГНЦСН, ІСГП) показали доцільність проведення ПЛР для ідентифікації сортів вітчизняної та світової колекції різноманіття хмелю звичайного. Результати досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму геному хмелю та розроблені на їх основі ДНК-маркери успішно впроваджуються в селекцію цієї культури для ідентифікації сортів та нового селекційного матеріалу, контролю автентичності та генетичної чистоти сортів, добору носіїв певних генів важливих агрономічних ознак, визначення соматоклональної варіабельності та генетичної стабільності, генетичного

картування, детекції та діагностики патогенів. При цьому використано різні типи молекулярних маркерів, зокрема: RAPD- (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR- (Simple Sequence Repeats), STS- (Sequence Tagged Sites), ISSR- (Inter-Simple Sequence Repeat), AFLP- (Amplified Fragment Lengths Polymorphism), SNP-маркери (Single Nucleotide Polymorphisms).

До найбільш привабливих для оцінки генетичного різноманіття хмелю віднесено мікросателітні (MC) або SSR-маркери, які мають високий ступінь поліморфізму, кодомінантний характер успадкування, високу відтворюваність результатів, можливість стандартизації набору маркерів та методик між лабораторіями, а також автоматизації аналізу.

Серед найпоширеніших методів виявлення поліморфізму послідовностей ДНК виділяють такі: аналіз довжин деструкційних фрагментів ДНК (ПДРФ) та аналіз поліморфізму за допомогою ПЛР та її різновидів: RAPD, ISSR, AFLP, SSR. Визначення оптимальних умов підготовки і проведення ПЛР для тканин хмелю і підбір найбільш відповідного методу виявлення його сортового поліморфізму дасть можливість з високою точністю визначити сортову чистоту рослин хмелю на всіх етапах їх росту і розвитку.

До 2005 року кількість MC маркерів хмелю звичайного була обмежена: перші чотири SSR- маркери розроблено (Bredy J.L. *ets.*, 1996) в 1996 році [12], в 2002 році (Jakse J. *ets.*, 2002) було запропоновано 11 [13] та в 2004 році (Nadonou A. *ets.*, 2004) - 10 нових маркерів [14]. Декількома групами дослідників проведено широкомасштабне виділення MC послідовностей геному хмелю шляхом конструювання SSR- збагачених геномних бібліотек та розроблено 60 MC маркерів [15, 16]. За локусами 11a59, 7a82, 3a88, 5-2 досліджено варіабельність 124 зразків дикого хмелю (з Європи, Азії, Північної Америки) та сортів і селекційних клонів світового генетичного різноманіття хмелю [13].

Поліморфізм MC локусів ДНК сортів хмелю вітчизняної селекції досліджувався Ю.М. Сиволапом зі співавторами [9], М.Д. Мельничуком та ін. [10], В.Б. Ковальовим та ін. [11]. Визначено, що кожний генотип української селекції має індивідуальний набір алелів досліджуваних локусів та запропоновано реєструвати генетичні карти сортів у вигляді генетичних літеро-числових або біномінальних формул для проведення ідентифікації

зразків із сумнівним походженням, нових генотипів, верифікації садивного матеріалу, експертизи сортів при їх державній реєстрації для захисту майнових і авторських прав селекційних установ.

Метою дослідження нами було окреслено комплекс питань щодо визначення стабільності геному сортів хмелю селекції ІСТП за умов тривалого періоду багаторазового пасажування та зберігання експлантів із колекції в умовах *in vitro*.

Методика досліджень. Об'єктом для досліджень виступали біотехнологічні методи визначення сортового поліморфізму ДНК хмелю.

В досліджах використовували сорти хмелю Кумир, Альта, Заграва та Славянка. Рослини відбирали згідно зі схемами розсадників та за характерними сортовими морфологічними і біохімічними ознаками в базовій колекції генофонду хмелю звичайного ІСТП НААН. Листя для аналізу відбирали з ідентифікованих рослин хмелю, з регенерантів *in vitro*, які були отримані з ініціальних рослин, а також з рослин, які зберігаються у колекції *in vitro*.

Живці висаджували у суміш торфу з піском і пророщували при температурі повітря +20 °С та освітленні 3 клк. Після того, як живці утворювали зелені пагони з п'ятьма-шістьма міжвузлями, з них відбирали листя і проводили виділення та очищення ДНК, згідно з розробленою нами методикою. У відібраних зразках проводили аналіз поліморфізму мікросателітних локусів за дванадцятьма відомими праймерами для диференціації та ідентифікації сортів хмелю: 11a-59, HIG-A3, 3a-88, 5-2, HIG-A4, HIG-A9, HIG-A29, HIG-T1, HIG-T2, HIG-T4, HIG-T5, HIG-T10.

Верхівки відібраних рослин стерилізували у 3%-му розчині хлораміну і висаджували на поживні середовища, які містили макроелементи за Ніччем (Nitsch, 1969), мікроелементи згідно з прописом Мурасіге-Скуга (Murashige, Scoog, 1962), глюкозу, кінетин і β-ІОК, які не мали у своєму складі мутагенних чинників. Після регенерації мікроживців рослини живцювали і процес повторювали. Кожен наступний пасаж проводили через два місяці. Субкультування експлантів проводили впродовж року. Для визначення стабільності геному регенерантів через півроку та через рік їх культивування *in vitro* проводили аналіз ДНК. Крім того, з колекції *in vitro* було відібрано рослини вищевказаних сортів, що культивувались протягом двох і більше років, у яких також було досліджено можливі зміни ДНК.

Виділення ДНК здійснювали за найбільш поширеними методами: шляхом протеолізу протеїназою K у присутності денатуруючого аніонного детергента SDS (додецилсульфат натрію) чи з використанням катіонного детергента – СТМВ (цетилтриметіламмоній-бромід). Додаткову мацерацію проводили у розчинах дриселази, пектинази чи целюлази виробництва фірми Sigma-AldrichChemie (Німеччина) у концентрації 10-20 мг/мл 0,4М манітола, при температурі 28 °С протягом 8–16 годин. Після цього проводили гомогенізацію рослинного матеріалу та очищення ДНК.

Визначення ДНК проводили за допомогою горизонтального електрофорезу на агарозному гелі. В дослідженнях використовували генний ампліфікатор GeneAmp PCR9700. Візуалізацію бендів ДНК в агарозному гелі і фотографування електрофоретичних профі-

Таблиця 1. Характеристика сортів хмелю, які досліджувалися

№ з/п	Сорт	Родовід сорту	Господарська характеристика
1	Славянка	ароматична жіноча рослина (UKR) / чоловіча форма I ₂ сорту F-108 (BEL)	Тонкоароматичний середньостиглий сорт, врожайність – 1,5-2,7 т/га; вміст альфа-кислот – 3,5-5,5%.
2	Заграва	ароматична жіноча рослина (UKR) / чоловіча форма I ₂ сорту F-108 (BEL)	Ароматичний середньостиглий сорт, врожайність – 1,9-2,8 т/га; вміст альфа-кислот – 5,4-8,5%.
3	Кумир	F ₄ сорту Кюн-72 (CZE) / чоловіча рослина із Колорадо (USA)	Гіркий середньостиглий сорт, врожайність – 1,6-2,8 т/га; вміст альфа-кислот – 11,0-14,5%.
4	Альта	Сорт Булліон (GBR) / вільне запилення	Гіркий ранньостиглий сорт, врожайність – 1,3-2,4 т/га; вміст альфа-кислот – 10,5-13,5%.

лів продуктів ПЛР-аналізу отримували за допомогою системи документування і аналізу гелів GelVue UV Transilluminator (компанії SAE-PLAS) згідно з інструкцією.

Результати досліджень. Значне поширення методу мікроклонального розмноження хмелю вимагає систематизації наукових знань щодо питання збереження стабільності сортових ознак рослин, які тривалий час знаходяться в умовах *in vitro*. За допомогою ПЛР-аналізу можна прослідкувати зміни геному рослин хмелю, якщо вони мають місце, на молекулярно-генетичному рівні. Для досягнення зазначеної мети нами проведені дослідження з визначення стабільності геному чотирьох вітчизняних сортів хмелю (табл. 1) впродовж їх тривалого культивування в умовах *in vitro*.

В даний час існує декілька різновидів методу ПЛР, але для сортової ідентифікації хмелю найбільш придатним методом є SSR-ПЛР, суть якого полягає у використанні мікросателітних тандемних повторів і ампліфікації відрізка ДНК, який знаходиться між цими повторами. Використання мікросателітних маркерів обумовлено їх значною інформативністю з огляду високого рівня поліморфізму, а використання SSR маркерів вітчизняними і закордонними дослідниками показало можливість застосування цього методу для диференціації та ідентифікації сортів хмелю. Для визначення соматклональної мінливості, яка

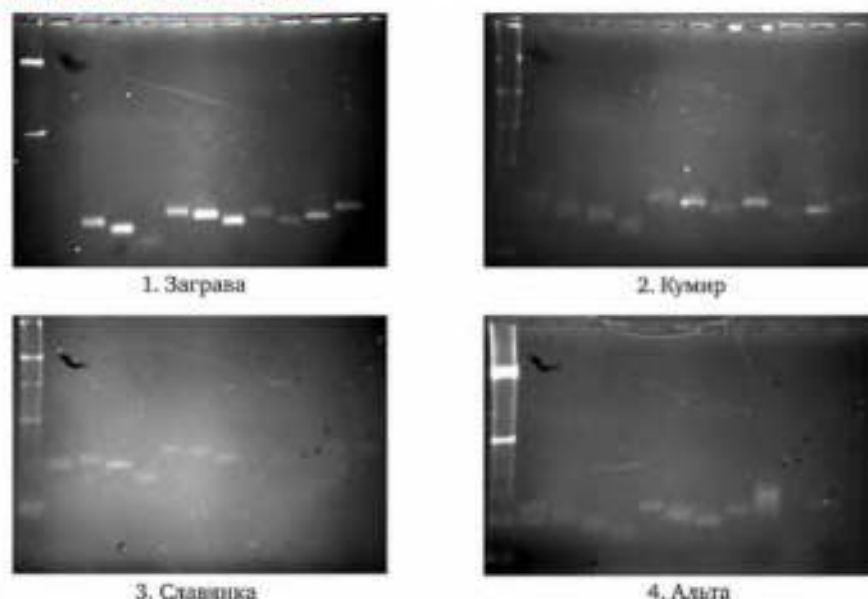
виникає в калюсних та клітинних культурах в умовах *in vitro*, використовують молекулярні маркери, застосування яких дає змогу встановити рівень генетичної мінливості на різних етапах культивування, а також пояснити питання щодо природи і часу виникнення генетичних змін.

За результатами дослідження молекулярно-генетичної мінливості чотирьох сортів хмелю при тривалому їх субкультивуванні у культурі *in vitro* на середовищах, які не містять мутагенів, було встановлено, що спектри ампліфікованої ДНК експлантів, які культивувались *in vitro* впродовж півроку, одного та двох років не відрізнялися від спектрів ДНК донорських рослин, одержаних до клонування (рис. 1).

Крім того порівнювали профілі ампліфікованих SSR-локусів з двох груп клонів, одна з яких перед введенням у культуру *in vitro* піддавалась впливу термотерапії, а друга ні. В результаті проведеної ПЛР було виявлено повний мономорфізм ампліфікованих фрагментів, як у клонів, що піддавались дії термотерапії, так і у клонів, що такій дії не піддавались.

Таким чином, застосування панелі з 12 праймерів для ДНК-ідентифікації рослин різного терміну культивування показало відсутність молекулярно-генетичних змін експлантів хмелю впродовж тривалого їх пасажування на поживних середовищах в культурі *in vitro*.

Рис. 1 Електрофоретичні профілі продуктів ПЛР-аналізу 4 вітчизняних сортів хмелю в агарозному гелі за 12 праймерами



ВИСНОВКИ

Спектри мікросателітних локусів ампліфікованої ДНК експлантів, які культивувалися *in vitro* протягом двох років не відрізняються від спектрів ДНК рослин до

клоування, що показує стабільність ДНК дає можливість культивувати сорти хмелю без змін геному протягом тривалого періоду в культурі *in vitro*.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Сиволап Ю.М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю.М. Сиволап, Н.Э.Кожухова, Р.Н. Календарь – Одесса, Агропринт – 336 с.
2. Кожухова Н.Е. Сучасні молекулярно-генетичні дослідження хмелю / Н.Е. Кожухова, А.М. Венгер, Ю.М. Сиволап, Б.Ф. Кормільцев // Агропромислове виробництво Полісся. — 2011. — Вип. 4. — С. 62–67.
3. Карлов Г. І. Молекулярно-генетичні і молекулярно-цитогенетичні підходи до прискореного створення селекційного матеріалу рослин із заданими властивостями: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук: спец. 03.00.23; 03.00 "біотехнологія, генетика" / Карлов Геннадій Ілліч – Москва, 2009. – 52 с.
4. Мельничук М. Д. Отримання безвірусного посадкового матеріалу хмелю (*Humulus lupulus L.*) в умовах *in vitro* / М. Д. Мельничук, А. А. Ключадовенко, О. А. Давиденко // Науковий вісник НАУ. – 2000. – Вип. 29. – С. 47–52.
5. Сиволап Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Ю.М. Сиволап, Р.Н. Календарь, Т.Г. Вербницкая, А.Ф. Брик, Н.Э. Кожухова и др. // Киев, Аграрна наука, 1998 – 156 с.
6. Шабляк В.В. Використання селекційних технологій покращення виробничого сортименту хмелю (Методичні рекомендації) / В.В. Шабляк, І.П. Штанько, К.П. Михайліченко, О.Л. Дзядович, Б.Ф. Кормільцев // Житомир, Інститут сільськогосподарства Полісся УААН, 2010. – 48 с.
7. Селекція хмелю. Методи випробувань. Технічні умови (НСТУ) 2027–2009. – К.: Держспоживстандарт України, 2011. – (Національний стандарт України).
8. Методика проведення експертизи сортів на відмінність, однорідність та стабільність (ВОС). Технічні та кормові культури / Під ред. В.В. Волкодава // Держ. служба з охорони прав на сорти рослин. – К.: Алефа, 2000 р. – 226 с.
9. 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 та ін. // Цитология и генетика. - 2010. - Т. 44, № 5. - С. 3-12.
10. Мельничук М.Д. ДНК-ідентифікація генотипів хмелю звичайного (*Humulus lupulus L.*) на основі SSR-маркерів (Методичні рекомендації) / М.Д. Мельничук, В.В. Оверченко, В.Г. Свиридонов, М.Ф. Парій // К.: Видавничий центр НАУ, 2008. – 26 с.
11. Ковальов В.Б. Молекулярно-генетична ідентифікація сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus L.*) за використанням SSR-маркерів (Методичні рекомендації) / В.Б. Ковальов, Б.Ф. Кормільцев, І.П. Штанько, О.В. Черненко // Житомир, Інститут сільського господарства Полісся НААН, 2015. – 20 с.
12. Brady J.L. DNA typing of hops (*Humulus lupulus L.*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS) / J.L. Brady, N.S.Scott, M.R. Thomas // Euphytica. – 1996. – Vol. 91. – P. 277–284.
13. Jakse J. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers / J. Jakse, K. Kindlhofer, B. Javornik // Centre for Plant Biotechnology & Breeding. - 2004. - Vol.144 (5). - P. 773-782.
14. Cerenak A. Identification and Differentiation of Hop Varieties Using Simple Sequence Repeat Markers / A. Cerenak, J. Jakse, B. Javornik // J. Amer. Soc. Brew. Chem. – 2004. – Vol. 62 (1). – P. 1-7.
15. Stajner N. Genetic structure and differentiation in hop (*Humulus lupulus L.*) as inferred from microsatellites / N. Stajner, Z. Satovic, A. Cerenak, B. Javornik // Euphytica. - 2008. - Vol. 161. - P. 301-311.
16. Данилова Т.В. Исследование полиморфизма сортов хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus L.*) с использованием ISSR-ПЦР-анализа / Т.В. Данилова, С.С. Данилов, Г.И. Карлов // Генетика. - 2003. - Т. 39. № 11. - С. 1484–1489.