

М. Д. Мельничук, В. В. Оверченко, В. Г. Спиридонов,
М. Ф. Парій, член-кореспондент НАН України І. П. Григорюк

Генетичне різноманіття сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) української селекції

*We demonstrate the possibility to apply SSR-PCR to the identification and differentiation of hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes of the Ukrainian selection using microsatellite loci. Phyllogenetic bonds between 13 Ukrainian cultivars of hop on the basis of SSR-markers are investigated.*

Хміль — цінна сільськогосподарська культура, шишки якого містять специфічні смоли, поліфенольні сполуки, ефірні масла і біологічно активні речовини, відзначаються смаковими, ароматичними, антибіотичними, антиокиснювальними та лікувальними властивостями [1].

Традиційні методи ідентифікації хмелю за морфологічними та господарськими ознаками [2] мають ряд недоліків. Показники фенотипічних ознак (форма листка, індекс щільності шишки, кількість луцупінових зерен і т. п.) залежать від фаз розвитку і віку рослин та агрохімічних чинників. Ідентифікацію сортів хмелю наявними методами проводять від кількох місяців до декількох років. Нині галузь хмелярства в Україні вимагає розробки принципово нових високочутливих методів сортової ідентифікації з використанням результатів аналізу геному.

На початку 90-х років минулого століття зарубіжними вченими [3, 4] було розроблено ряд технологій виявлення поліморфізму на рівні геномної ДНК. Серед найпоширеніших методів виділяють аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК (RFLP) [5], а також за допомогою полімерної ланцюгової реакції (ПЛР) та її різновидностей, зокрема RAPD [6], ISSR [7], AFLP [8], SSR [9].

Для вирішення завдань ідентифікації і диференціації генотипів хмелю звичайного нами використано метод SSR-ПЛР, оскільки SSR маркери відзначаються рядом переваг, які є сайтспецифічними, тобто відома їх локалізація в геномі рослини, причому даний тип маркерів характеризується кодомінантним типом успадкування. Один локус може мати значну кількість алельних варіантів. Відповідно, система ідентифікації і диференціації сортів хмелю на основі SSR-маркерів набуває значної диференційно-ідентифікаційної здатності. У світовій літературі описано значну кількість мікросателітних локусів хмелю та досліджено поліморфізм за цими маркерами. Показано, що більшість з них придатні для оцінки генетичного різноманіття [6, 10, 11].

Мета наших досліджень — опрацювання і модифікація ПЛР методик з використанням синтезованих власно мікросателітних локусів, відомих з літературних джерел, для диференціації й ідентифікації генотипів хмелю та визначення філогенетичних зв'язків між 13 сортами хмелю української селекції, які одержано на безвірусній основі в умовах *in vitro* в лабораторії фітовірусології та біотехнологій Національного аграрного університету.

Аналіз на вірусноносійство здійснювали за допомогою електронної мікроскопії, РТ-ПЛР [12] та шляхом виділення дволанцюгових форм РНК при реплікації вірусів у рослинах [13]. Для досліджень відбирали листки і стебла рослин хмелю звичайного, що були введені

в культуру *in vitro*. Маса одного зразка для виділення ДНК становила 0,1–0,15 г. Нами проаналізовано 13 генотипів хмелю української селекції, що занесені в Державний реєстр сортів рослин України за період з 1995 по 2006 р. У дослідженнях використовували сорти хмелю Руслан, Триумф, Національний, Славянка, Кумир, Промінь, Злато Полісся, Оболонський, Хмелеслав, Альта, Потіївський, Гайдамацький та Заграва. ДНК виділяли з гомогенату листків та стебел хмелю на основі методу з використанням гуанідинтіоціонату [14]. ПЛР здійснювали в об'ємі реакційної суміші — 25 мкл (10х дНТФ, 5х ПЛР буфер 1,5–3 ммоль MgCl₂, 1 од. *Taq* ДНК-полімерази, “АмпліСенс”, Росія) із використанням 10 пмоль кожної пари праймерів, 100 нг геномної ДНК хмелю. Ампліфікацію проводили на приладі Applied Biosystems 2400. Умови реакції: початкова денатурація 94 °С — 5 хв, потім 36 циклів за умов — денатурація 94 °С — 45 с, ренатурація (гібридизація) 63 °С — 1 хв 30 с, елонгація 72 °С — 30 с, заключний цикл — фінальна елонгація 72 °С — 10 хв. Продукти ампліфікації візуалізували в 3% агарозному гелі в 1^xТАЕ-буфері з УФ-візуалізацією бромистим етидієм.

Розподіл продуктів ампліфікації здійснювали на ABI Prism 3130 генетичному аналізаторі. Суміш для капілярного електрофорезу містила 1 мкл розбавленого ПЛР-зразку, 11,5 мкл Hi-Di формаміду (Applied Biosystems) і 0,5 мкл Genescan-350 ROX стандарту (Applied Biosystems), яку аналізували за інструкцією виробника. Розмір флуоресцентних мічених ПЛР-продуктів (у парах нуклеотидів) вивчали за допомогою комп'ютерної програми “Genescan” та “Genotyper”. Для визначення генетичних зв'язків і побудови дендрограми використовували програми TREECON for Windows (version 1.3) та Neighbor-Joining UPGMA method version 3.67.

Для генетичного аналізу застосовували 10 мікросателітних відомих локусів: 11a-59, 7a-82, HIG-A3, HIG-T1, HIG-T5, 3a-88, 5-2, HIG-A4, HIG-A9, HIG-T2 [7]. Нами встановлено, що 9 з 10 локусів є поліморфними, за винятком локусу 7a-82, який був мономорфним для генотипів хмелю. Проведеним ПЛР аналізом виявлено 45 алелів. Результати диференціації мікросателітних локусів за довжиною алелей наведено в табл. 1.

Доведено, що найменша кількість алелів міститься в локусах 11a-59 і 7a-82 — два алеля з розмірами 179 та 190 пар нуклеотидів у першому локусі, 196 та 198 — у другому. При типуванні геномів хмелю з праймерами до мікросателітних локусів 3a-88 і 5-2 визначено сім алелів з диференційованими розмірами — 191, 193, 196, 198, 200, 219, 223 та 149, 168,

Таблиця 1. Алелі мікросателітних локусів, виявлених при генотипуванні 13 сортів хмелю звичайного української селекції

Локус	Алель							Кількість алелів, шт.	PIC
	A	B	C	D	E	F	G		
11a-59	179	190	—	—	—	—	—	2	0,50
7a-82	196	198	—	—	—	—	—	2	—
HIG-A3	147	150	156	—	—	—	—	3	0,46
HIG-T1	254	260	262	264	266	—	—	5	0,64
HIG-T5	187	198	201	208	212	232	—	6	0,68
3a-88	191	193	196	198	200	219	223	7	0,72
5-2	149	168	176	179	181	183	185	7	0,77
HIG-A4	225	232	234	241	—	—	—	4	0,62
HIG-A9	194	216	218	220	226	—	—	5	0,73
HIG-T2	212	214	218	220	—	—	—	4	0,59
Загальна кількість алелів								45	
Середня кількість алелів на один мікросателітний локус								4,5	

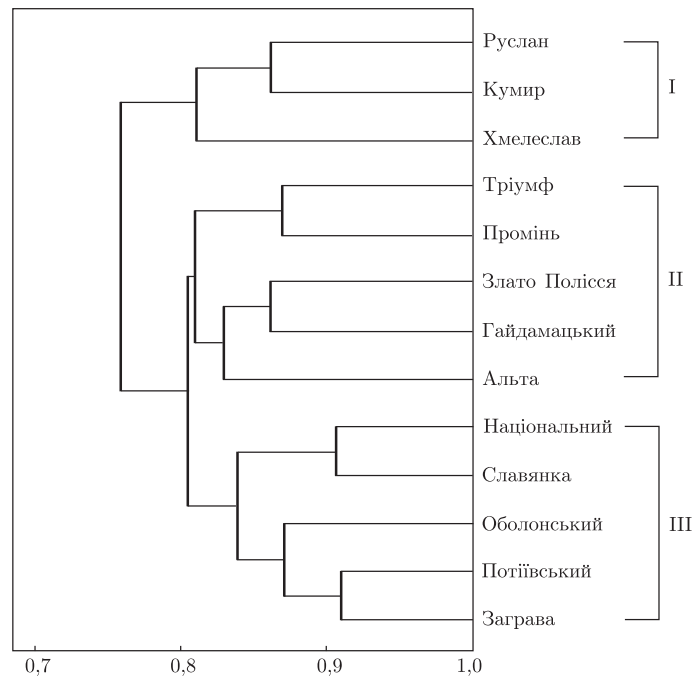


Рис. 1. Дендрограма філогенетичних взаємозв'язків на основі 10 SSR-маркерів 13 генотипів хмелю звичайного української селекції

176, 179, 181, 183, 185 пар нуклеотидів відповідно. Три алеля зафіксовано за допомогою електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації з праймерами до мікросателітних локусів HIG-A3, чотири — в локусах HIG-A4 і HIG-T2, п'ять — в HIG-T1 та HIG-A9, шість — в HIG-T5. Середня кількість алелів на один генотип становить 4,5.

Індекс поліморфного інформаційного змісту PIC характеризує дискримінаційну потужність локусу за кількістю алелів і відносною частотою, з якою алель зустрічається. Рівень інформативності маркерної системи (див. табл. 1) за 9 з 10 локусів виявився високим, за винятком локусу 7a-82, який є мономорфним. Для проаналізованих локусів PIC коливається в межах від 0,50 для локусу 11a-59 до 0,77 для локусу 5-2.

Для спрощеного запису генотипів рослин хмелю визначено алелі залежно від їхнього розміру, які позначали латинськими літерами A, B, C, D, E, F, G, де A — найменший за розмірами алель при електрофоретичному поділі продуктів ампліфікації, літера B відповідає наступному за розміром алелю, G — найбільший фрагмент у мікросателітних локусах 3a-88 та 5-2. У результаті такого кодування можна створити базу сортів хмелю української селекції.

Експериментально встановлено, що сорт хмелю Руслан містить 23 алеля, Тріумф — 20, Національний — 17, Славянка — 12, Кумир — 15, Промінь — 19, Злато Полісся — 17, Оболонський — 18, Хмелеслав — 14, Альта — 14, Потіївський — 18, Гайдамацький — 21, Заграва — 18. Для створення комп'ютерного банку генетичних паспортів сортів хмелю української селекції нами переведено отримані дані в бінарний вираз. Наявність або відсутність певного алеля позначається як "1" або "0". За таким принципом можна побудувати генетичний паспорт геному хмелю. Це дозволяє легко ідентифікувати і диференціювати проаналізовані за даними 10 мікросателітними локусами сорти та вихідний селекційний матеріал хмелю. Аналіз сортів хмелю за 10 SSR-маркерами показав, що кожен представ-

лений генотип має власний і унікальний набір алелів. Це дозволяє чітко розрізняти їх при проведенні SSR-ПЛР аналізу.

На підставі поліморфізму SSR-маркерів нами побудовано дендрограму філогенетичних взаємозв'язків, яку розраховували за наявними алелями 10 мікросателітних локусів 13 генотипів хмелю (рис. 1). Найбільшою спорідненістю відзначались сорти хмелю Потіївський і Заграва (0,091), найменшою — Руслан та Заграва (0,24), що є мінімальним та максимальним показником спорідненості між сортами хмелю.

Запропонована нами система генотипування дозволяє створити розширений комп'ютерний банк генетичних паспортів і вихідного селекційного матеріалу. На підставі отриманих даних можна з високою точністю проводити ідентифікацію та диференціацію сортів хмелю.

Таким чином, нами вперше показано можливість використання розробленої тест-системи за 10 мікросателітними локусами для ДНК-аналізу на прикладі проаналізованих 13 сортів хмелю звичайного української селекції. Виявлено 45 алелів, кількість яких за локусами коливається від 2 до 7. Побудовано філогенетичну дендрограму, яка демонструє ступінь спорідненості між сортами хмелю звичайного, які умовно розподілено на три кластери за ПЛР-аналізом геномної ДНК SSR-маркерами. До I кластеру належать сорти хмелю Руслан, Кумир і Хмелеслав, до II — Триумф, Промінь, Злато Полісся, Гайдамацький та Альта, до III — Національний, Славянка, Оболонський, Потіївський та Заграва. У межах I і II кластерів найбільша генетична відстань становить 0,19, III — 0,16.

1. Герасимчук В. И., Рейтман И. Г., Ежов И. С. Хмель в медицине, быту и народном хозяйстве / Под ред. И. С. Ежова. — Киев: Урожай, 1994. — 352 с.
2. Жигало Ю. В. До методики ідентифікації сортів хмелю (*Humulus lupulus* L.) за морфологічними ознаками // Хмелярство. — 2005. — Вип. 22. — С. 17–25.
3. Leggett G. W., Salier D. G., Brady J. L. et al. DNA typing and the identification of hops // Monogr. Eur. Brew. Conv. — 1994. — 22. — P. 45–55.
4. Murakami A. The practical application of PCR for the verification of hop varieties // Tech. Q. Master Brew. Assoc. Amer. — 1998. — 35. — P. 185–188.
5. Patzak J. Characterization of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes by molecular methods // Rostl. výroba. — 2002. — 48, No 8. — P. 334–350.
6. Jakse J., Kindlhofer K., Javornik B. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers // Genome. — 2001. — 44. — P. 773–782.
7. Cerenak A., Jakse J., Javornik B. Identification and differentiation of hop varieties using simple sequence repeat markers // J. Amer. Soc. Brew. Chem. — 2004. — 62, No 1. — P. 1–7.
8. Jakse J., Satovic Z., Javornik B. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.) // Genome. — 2004. — 47. — P. 889–899.
9. Junhua Z., Yan Lin, Yuchao Gu et al. Discrimination of tsingtaodahua from other hop cultivars and its quality control by molecular analyses // J. Inst. Brew. — 2005. — 111, No 2. — P. 229–233.
10. Cerenak A., Satovic Z., Javornik B. Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content // Genome. — 2006. — 49. — P. 485–494.
11. Brady J. L., Scott N. S., Thomas M. R. DNA typing of hops (*Humulus lupulus* L.) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS) // Euphytica. — 1996. — 91. — P. 277–284.
12. Мельничук М. Д., Оверченко В. В., Дубін О. В. Діагностика латентного вірусу хмелю на сортах української селекції // Мікробіол. журн. — 2003. — 65, № 4. — С. 43–50.
13. Мельничук М. Д., Валверді Р. А. Діагностика та ідентифікація РНК-вмісних фітовірусів на стадії їх біосинтезу шляхом вивчення фізико-хімічних властивостей вірусних дволанцюгових РНК // Доп. НАН України. — 2001. — № 3. — С. 175–179.
14. Boon R., Soi C. J. A., Salimans M. M. et al. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. — 1990. — 28. — P. 495–503.