

and improve plant regeneration in barley anther culture *in vitro*. Investigations aimed to evaluate the efficiency of agar substitution for new preparation of chemically modified starch D-5aM in medium for spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. **Methods.** Plants were grown under field conditions. Anthers were isolated from spikes of F₁ hybrids of five combinations and two model genotypes. Inductive media were differed by gelling component. Control contained agar, two experimental variants included chemically modified starch D-5aM at two concentrations. **Results.** There has been conformed positive effect of agar substitution for less costly chemically modified starch on direct embryo formation and regeneration efficiency. It was revealed that lower concentration of starch decrease regeneration frequency in high responsive genotype and at the same time increased that one in cultivar possessing low androgenic capacity. **Conclusions.** Obtained data indicate advantage of chemically modified starch in comparison with agar. Perspective preparation D-5aM is recommended for application in plant biotechnology.
Key words: *Hordeum vulgare* L., barley, anther culture *in vitro*, nutrient media, agar, chemically modified starch, morphogenesis.

УДК 633.791:575.113

ВЕНГЕР А.М., ВОЛКОВА Н.Е.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: venger87@ukr.net

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТИПУ СОРТУ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО ЗА МОЛЕКУЛЯРНИМИ МАРКЕРАМИ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ХАЛКОНСИНТАЗИ

Хмель звичайний *Humulus lupulus* L. – важлива сільськогосподарська культура, що використовується у харчовій, медичній та парфумерній галузях. Господарське значення хмелю звичайного обумовлене в більшій мірі наявністю в шишках гірких α - і β -кислот та ароматичних речовин – пренілфлавоноїдів. Синтез даних речовин каталізується ферментами халконсинтазами. У хмелю звичайного відомо п'ять халконсинтаз – халконсинтаза 1 (CHS_{H1}), халконсинтаза 2 (CHS₂), халконсинтаза 3 (CHS₃), халконсинтаза 4 (CHS₄) та валерофенонсинтаза (VPS), що кодуються генами *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, відповідно [1].

При визначенні типу сорту хмелю (гіркий або ароматичний) використовують кількість гірких кислот (табл.) та ефірної олії. Пренілфлавоноїди та α - і β -кислоти не є прекурсорами ефірної олії, проте рівень α - і β -смол (похідних α - і β -кислот) прямо пов'язаний з рівнем ефірної олії [2]. Визначення рівня α - та β -кислот проводиться методами газової та

високоєфективної рідинної хроматографії, яка є дорогою та довготривалою процедурою [3].

Незважаючи на значний обсяг молекулярно-генетичних досліджень геному хмелю з використанням різних видів ДНК-маркерів, огляд літератури показав відсутність робіт, присвячених розробці молекулярних маркерів для ідентифікації типу сорта. Тому мета даної роботи полягала в оцінюванні можливості ідентифікації типу сорта за молекулярними маркерами генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* хмелю звичайного.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували 20 сортів хмелю звичайного селекції Інститута сільського господарства Полісся НААН, для яких визначено тип сорту: гіркі сорти – Альта, Зміна, Ксанта, Кумир, Надія, Назарій, Оболонський, Поліський, Промінь, Чаклун; ароматичні сорти – Видибор, Гайдамацький, Житомирський 75, Заграва, Клон 18, Оскар, Пивовар, Полісянка, Славянка, Хмелеслав.

Таблиця. Біохімічні критерії визначення типу хмелю [2]

Показник	Тип сорту	
	ароматичний	гіркий
Масова доля когумулолу в складі α -кислот, %	< 30	> 30
Масова доля колупулолу в складі β -кислот, %	< 50	> 50
Співвідношення кількості β -кислот до α -кислот, %	> 0,9	< 0,7

Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* (довжини продуктів ампліфікації у п.н.) у вибірці вищенаведених сортів отримано нами у попередніх дослідженнях[4–6].

Кластерний аналіз даних молекулярно-генетичного аналізу проводили за допомогою програми MEGA5 незваженим парногруповим методом з арифметичним усередненням (UPGMA) [7].

Достовірність перевіряли за допомогою коефіцієнту рангової кореляції Спірмана [8] для малих вибірок:

$$r = 1 - 6(\sum d^2 / (n^3 - n)),$$

де r – коефіцієнт кореляції рангів, d – квадрат різниці між рангами, n – кількість ознак, що брали участь у ранжуванні. Якщо серед значень X (тип сорту – гіркий або ароматичний) та значень Y (значення маркерів) зустрічається декілька однакових, утворюються пов'язані ранги, тобто однакові середні номери. У таких випадках коефіцієнт Спірмана обраховували за формулою:

$$r = 1 - 6(\sum d^2 - A - B / (n^3 - n - 12A)(n^3 - n - 12B)),$$

де $A = \sum(A_j^3 - A_j)/12$; $B = \sum(B_k^3 - B_k)/12$, j – номери зв'язок по порядку для ознаки X ; A_j – число однакових рангів в j -й зв'язці для ознаки X ; k – номери зв'язок по порядку для значення Y ; B_k – число однакових рангів в k -й зв'язці для значення Y .

Для того, щоб на рівні значущості α перевірити нульову гіпотезу про дорівнювання нулю коефіцієнта рангової кореляції Спірмана

H_0 ; $r = 0$ при конкуруючій гіпотезі H_1 ; $r \neq 0$, обраховували критичну точку:

$$T_{kr} = t(\alpha, k) \sqrt{\frac{1 - r^2}{n - 2}},$$

де n – об'єм вибірки; r – вибірковий коефіцієнт рангової кореляції Спірмана; $t(\alpha, k)$ – критична точка двосторонньої критичної області, яку знаходять по таблиці критичних точок Ст'юдента, за рівнем значущості α та числу ступенів свободи $k = n - 2$.

Якщо $|r| < T_{kr}$ – нульова гіпотеза підтверджується. Ранговий кореляційний зв'язок між ознаками незначущий. Якщо $|r| > T_{kr}$ – нульова гіпотеза не підтверджується, ранговий кореляційний зв'язок між ознаками значущий.

Довірчий інтервал обраховували за формулою:

$$r \pm t((1 - r^2) / \sqrt{n});$$

Результати і обговорення

Для кластерного аналізу використовували сумарні дані молекулярно-генетичних досліджень поліморфізму інтрону, 3'-нетрансльованого регіону та екзону 2 гена *chs_H1*; інтронів генів *chs2*, *chs3*, *chs4*; промотора та локуса, що складається з екзона 1, інтрона та екзона 2, гена *vps* сортів хмелю звичайного української селекції. Результат кластерного аналізу відображений на рис.

Дендрограма містить два кластери (I і II). До кластеру I увійшли всі гіркі сорти, до кластеру II – всі ароматичні.

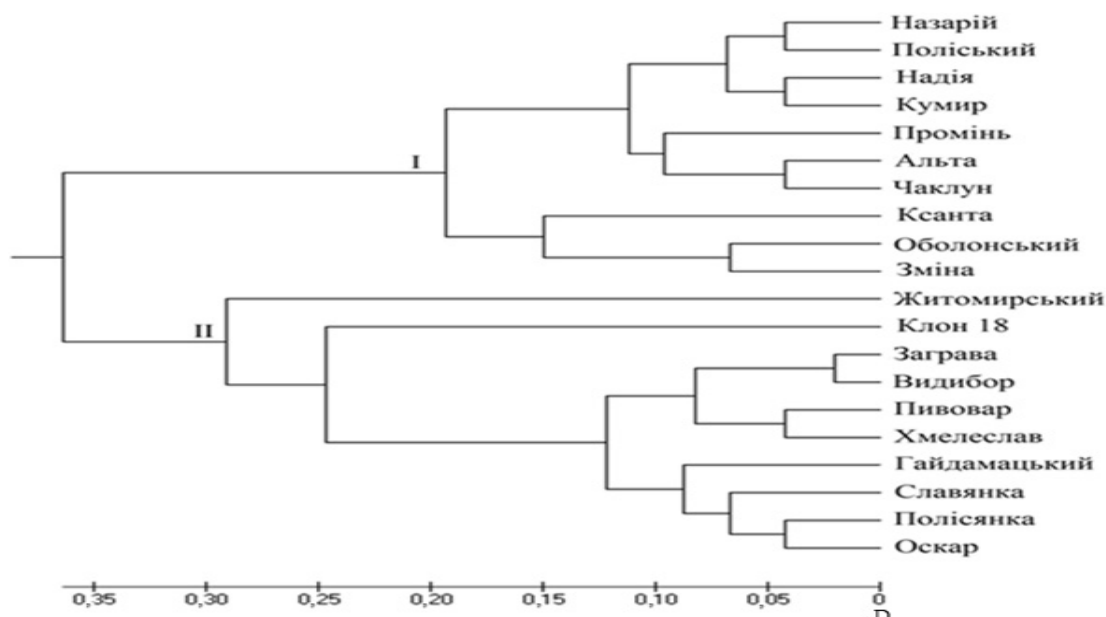


Рис. Дендрограма, побудована за результатом кластерного аналізу поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* сортів хмелю звичайного української селекції. I і II – кластери

Значення критичної точки $T_{кр}$ складає 0,190, значення коефіцієнта Спірмана r складає 0,881.

$|r| > T_{кр}$ ($0,881 > 0,19$), це означає, що нульова гіпотеза не підтверджується; ранговий кореляційний зв'язок між ознаками значущий. Довірчий інтервал r був (0,79; 0,97).

Таким чином, зв'язок між показником «тип сорту» (гіркий або ароматичний) та поліморфізмом певних регіонів генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* хмелю звичайного є прямим, значущим та в межах довірчого інтервалу.

Слід зазначити, що кластерний аналіз даних молекулярно-генетичних досліджень поліморфізму окремих регіонів генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* та поліморфізму окремих сортів та їх поєднань не призвів до угруповування сортів за типом. Чітка кластеризація за типом здійснилась тільки при використанні сумарних

даних щодо поліморфізму всіх досліджених генів. Це означає, що для синтезу певних кількостей когумолону, колуполону та отримання певного співвідношення β - і α -кислот, що призводить до формування показника «тип сорту», важливим є алельний стан всіх генів, що кодують халконсинтази, *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*.

Висновки

Встановлено зв'язок між поліморфізмом генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, що кодують халконсинтази, та показником «тип сорту». Показано можливість використання молекулярних маркерів, за допомогою яких виявлено поліморфізм вищенаведених генів, для ідентифікації ароматичного або гіркого типу сорту. Розроблений підхід ідентифікації типу сорту хмелю за молекулярними маркерами. є статистично достовірним, не є дорогою і довготривалою процедурою.

Література

1. Austin M.B., Noel J.P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases // Natural Product Reports. – 2003. – 20. – P. 79–110.
2. Ляшенко Н.И., Михайлов Н.Г., Рудык Р.И. Физиология и биохимия хмелю. – Житомир: «Полісся», 2004. – С. 405.
3. Patzak J., Nesvadba V., Hencychova A., Krofta K. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses // Biochemical Systematics and Ecology. – 2010. – 38. – P. 136–145.
4. Венгер А.М., Волкова Н.Е., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетичний поліморфізм гена *chs_H1* у сортів хмелю звичайного української селекції // Цитологія і генетика. – 2014 (у друці).
5. Венгер А.М., Волкова Н.Е. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *chs2*, *chs3*, *chs4* у сортів хмелю звичайного української селекції // Вісник Запорізького національного університету. – 2014 (у друці).
6. Venger A., Volkova N. Molecular-genetic polymorphism of *vps* gene in Ukrainian hop varieties // Modern science. – 2014 (у друці).
7. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – 28, N 10. – P. 2731–2739.
8. Spearman C. The proof and measurement of association between two thing // Amer. J. Psychol. – 1987. – 100, N 3–4. – P. 441–471.

VENGER A.M., VOLKOVA N.E.

Plant Breeding and Genetics Institute – National center of seed and cultivar investigation, Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopol's'ka doroga str., 3, e-mail: venger87@ukr.net

IDENTIFICATION OF HOP TYPE BY MOLECULAR MARKER OF CHALCONE SYNTHASE ENCODED GENES

Aims. Hop *Humulus lupulus* is a commercial important plant in Ukraine. The primary commercial application of the hop plants has been in the beer brewing industry. Most important substances from hop are bitter acids. Depending on level of bitter acids hop varieties derive in aroma and bitter. The purpose of present work was to study the possibility of hop types identification according to polymorphism of *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* and *vps* genes in sampling of 20 Ukrainian hop varieties. **Methods.** Cluster analysis of hop type varieties was derived by analysis of gene polymorphism using UPGMA. Reliable was calculated by Spearman coefficient. **Results.** The cluster analyses of 20 Ukrainian hop varieties based on gene polymorphism data resulted in pure differentiation of studied varieties into bitter and aroma clusters. **Conclusions.** Dependence between *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* and *vps* genes polymorphism and type of hop

variety was shown. The method of type identification of hop varieties by molecular markers was developed. The elaborated method is statistically reliable and does not need much time or expensive reagents.
Key words: *Humulus lupulus*, gene polymorphism, molecular markers, aroma and bitter varieties.

УДК 577.2:58.036.5:633.11

ГАЛАЕВА М.В., ФАЙТ В.И., ГАЛАЕВ А.В., ФЕДОРОВА В.Р., СИВОЛАП Ю.М.

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения, Украина, 65036, м. Одесса, Овидиопольская дорога, 3, e-mail: mariagall@rambler.ru

МОРОЗОСТОЙКОСТЬ РЕКОМБИНАНТНО-ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ И ЕЕ СВЯЗЬ С АЛЛЕЛЯМИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

Пшеница мягкая озимая – одна из наиболее распространенных злаковых культур в мире. Достаточный уровень зимо- и морозостойкости определяет стабильность урожая озимых культур и ареал распространения конкретного сорта. В суровые зимы на территории Украины наблюдается значительная гибель посевов пшеницы озимой, а на уцелевших площадях отмечены различные не летальные повреждения растений, которые приводят к резкому снижению урожая. Поэтому создание сортов озимой мягкой пшеницы с высоким генетически обусловленным уровнем морозостойкости – одна из важных задач селекции в Украине [1, 2].

Привлечение молекулярно-генетических методов помогает идентифицировать и отбирать в процессе селекции генотипы с необходимыми генами. Использование указанных методов позволяет выявить специфические фрагменты ДНК, тесно сцепленные с определенными генами морозостойкости. С помощью молекулярных маркеров на длинных плечах хромосом пятой гомеологической группы локализованы главные гены морозостойкости, а именно, гены *Fr-A1* и *Fr-A2* на хромосоме 5A, *Fr-B1* – на 5B и *Fr-D1* – на 5D [3, 4]. Большая часть маркеров к указанным генам были получены с помощью достаточно трудоемкого ПДРФ-анализа, а ПЦР-маркеры не были эффективными для сортов украинской селекции. Возникла необходимость в поиске новых ПЦР маркеров к генам морозостойкости у украинских сортов пшеницы.

В наших предыдущих исследованиях был проведен анализ морозостойкости и микросателлитный анализ популяций пшеницы мягкой озимой и установлена связь аллельных различий ряда локусов с уровнем морозостойкости пшеницы [5, 6]. Настоящее исследование является продолжением

указанных работ. Его цель – анализ рекомбинантно-инбредных линий F₇ пшеницы мягкой озимой Лузановка одесская/Одесская красноколосая по аллелям микросателлитных (МС) локусов хромосом пятой гомеологической группы и оценка связи аллельных различий МС-локусов с морозостойкостью пшеницы.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили родительские формы и 101 рекомбинантно-инбредная линия (РИЛ) F₇ комбинации скрещивания Лузановка одесская/Одесская красноколосая. Лузановка одесская относится к группе сортов с уровнем морозостойкости «выше среднего», а Одесская красноколосая имеет относительно «низкий» уровень морозостойкости.

Оценку морозостойкости РИЛ проводили с помощью искусственного промораживания проростков и растений в фазе кушения согласно методике [7]. Промораживание проростков осуществляли трижды в течение 2008 года при –12 °С.

Для определения морозостойкости растений в фазе кушения семена РИЛ высевали в октябре 2010 и 2011 на трехрядных участках длиной 1 м по 50 зерен на рядок с площадью питания отдельного растения 30x2 см². В I декаде февраля и I декаде марта 2011 года и I декаде января 2012 года с поля отбирали по 25–85 растений каждой линии и промораживали при температуре –16 °С.

ПЦР с направленными праймерами проводили на термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Реакционная смесь содержала буфер (67 мМ трис-НСl pH 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01% Tween-20); 0,2 мМ каждого dNTP; 0,25 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 1 ед. Taq-полимеразы. Условия реакции – 35 циклов: денатурация при 94 °С – 30 с (начальная – 2 мин), отжиг при 55 °С, 58 °С,