

Ж.В. ВДОВИЧЕНКО, К.С. СИТНИК, І.Ю. СТУПАК, В.Г. СПИРИДОНОВ,
С.Д. МЕЛЬНИЧУК, М.Д. МЕЛЬНИЧУК, М.Ф. ПАРИЙ

Національний університет біоресурсів та природокористування України, Київ
E-mail: pariimyroslov@gmail.com

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ СОРТІВ ЯЧМЕНЮ (*HORDEUM VULGARE* L.), ВИЯВЛЕНИЙ МЕТОДОМ AFLP

Проаналізовано молекулярно-генетичний поліморфізм сортів ячменю методом AFLP. Розроблено систему ідентифікації та диференціації сортів ячменю на основі AFLP-маркерів. Результати апробації на 19 сортах свідчать про високу диференційну здатність розробленої системи. Ідентифікація сортів може проводитись із використанням одного з двох запропонованих дискримінаційних наборів AFLP-маркерів. На основі розрахованих генетичних дистанцій побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків між сортами, яка виявила відокремлене походження сортів пивоварного та кормового напрямків.

Ключові слова: AFLP, молекулярні маркери, ячмінь, ідентифікація сортів.

Вступ. ДНК-маркери – потужний інструмент для досліджень у різних галузях біологічної науки: ботаніці, генетиці, фітопатології та ін. Генотипування сортів культурних рослин за допомогою ДНК-маркерів вирішує ряд важливих завдань селекції та насінництва, такі як ідентифікація сортів, гібридів та ліній, визначення показників якості партій насіння, а саме сортової чистоти самозапильних культур або типовості перехреснозапильних культур, гібридності, стерильності. На сьогодні широко використовуються такі основні типи ДНК-маркерів, що відповідають вимогам високої інформативності та відтворюваності: це SNP-аналіз (Single Nucleotide Polymorphism), мікросателітний або SSR-аналіз (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) [1]. Кожен з цих методів має свої особливості. Висока інформативність системи AFLP, що пов'язана з полілокусністю цієї системи, дозволяє з легкістю ідентифікувати сорти культурних рослин [1]. Дана технологія ДНК-аналізу не вимагає попередніх досліджень первинної нуклеотидної послідовності, так само як, напри-

клад, і при RAPD-аналізі (Randomly Amplified Polymorphic DNA), проте на відміну від останнього AFLP-система характеризується високою надійністю завдяки високій відтворюваності результатів [2].

Висока інформативність та надійність системи AFLP забезпечується завдяки певним методичним особливостям. Отримання поліморфних ампліфікованих фрагментів включає наступні етапи: рестрикція геномної ДНК парою рестриктаз, приєднання рестрикційних фрагментів до спеціально сконструйованих дволанцюгових адаптерів (лігування) та двоетапна ПЛР. В оригінальній методиці Vos et al. [2] як рестрикційні ендонуклеази використано EcoRI та MseI, при цьому EcoRI має сайт рестрикції, послідовність якого рідко зустрічається у геномній ДНК, а MseI належить до рестриктаз, що часто розщеплюють ДНК. Застосування двох рестриктаз забезпечує ряд методичних переваг.

1. Рестриктаза, що часто розщеплює, генерує короткі фрагменти ДНК, котрі зручно ампліфікувати та розділяти у гелі.

2. Число фрагментів, що ампліфікуються, може бути зменшене за рахунок використання рестриктази, що рідко розщеплює, оскільки ампліфікуються тільки фрагменти, утворені внаслідок роботи двох рестриктаз (EcoRI – MseI). Таким чином, можливе регулювання кількості фрагментів в реакції.

3. Оскільки для електрофорезу використовують денатуровані одностанцюгові фрагменти ДНК, застосування двох рестриктаз робить можливим мітити тільки один з двох ланцюгів ПЛР-продукту. Це запобігає появі дублетів у гелі за рахунок нерівної рухливості двох ланцюгів ампліфікованих фрагментів.

4. За рахунок комбінування невеликої кількості праймерів можливо отримувати велику кількість фінгерпринтів [2]. В оригінальній методиці умови рестрикції та ПЛР, дібрані пос-

© Ж.В. ВДОВИЧЕНКО, К.С. СИТНИК, І.Ю. СТУПАК,
В.Г. СПИРИДОНОВ, С.Д. МЕЛЬНИЧУК,
М.Д. МЕЛЬНИЧУК, М.Ф. ПАРИЙ, 2014

лідовності праймерів та адаптерів забезпечують ампліфікацію лише фрагментів EcoRI – MseI. Фрагменти EcoRI – EcoRI, MseI – MseI не ампліфікуються [2].

Застосування двоетапної ампліфікації дозволяє запобігати неспецифічній ампліфікації, адже було показано, що використання праймерів із чотирма додатковими нуклеотидами в один етап викликає значний рівень появи неспецифічних фрагментів. Найімовірніше, що така неспецифічність виникає при спарюванні першого селективного нуклеотида, що є найбільш віддаленим від 3'-кінця праймера [2].

Поліморфізм ДНК з використанням системи AFLP широко досліджується у різних сільськогосподарських культур незалежно від їх попередньої вивченості у генетичному плані, у тому числі і в ячменю. Показана висока ефективність AFLP-технології для ідентифікації сортів, екотипів, видів рослин [3–11]. Можливість отримання великої кількості поліморфних фраг-

ментів, яку забезпечує дана технологія, дозволяє створювати щільні генетичні карти [12–16] та отримувати надійні молекулярні маркери якісних ознак [14, 17], локусів кількісних ознак (QTL) [15, 18], хромосом-специфічні маркери [19]. Вона незамінна для ідентифікації ізогенних та мутантних ліній, відмінності між якими можуть зводитися лише до невеликої ділянки геному [14, 17, 20].

В Україні у Південному біотехнологічному центрі проведено роботу з ідентифікації та паспортизації сортів ячменю південноукраїнської селекції [21–23]. З цією метою було використано RAPD, IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism), REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) та мікросателітні маркери. При порівнянні монолокусних (мікросателіти) та полілокусних (IRAP та REMAP) маркерних систем авторами зазначено, що застосування полілокусних систем забезпечує кращу диференційну здатність при іденти-

Таблиця 1. Перелік досліджуваних сортів ярого ячменю

Сорт	Напрямок використання	Дворядність – шестирядність	Тип розвитку	Країна селекційного центру
Danuta	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Німеччина
Оболонь	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Україна, Одеса
Barke	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Великобританія
Jersey	Пивоварний, зернофуражний	Дворядний	Ярий	Великобританія
Звершення	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Україна, Харків
Цезар	Пивоварний	Дворядний	Озимий	Україна
Celinka	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Франція
Джерело	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Україна, Харків
Adagio	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Франція
Tolar	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Чехія
Чарівний	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Україна, Одеса
Pejas	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Чехія
Mars	Пивоварний, зернофуражний	Шестирядний	Ярий	США
Husky	Зернофуражний	Шестирядний	Ярий	Канада
Freja	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Швеція
Steptoe	Зернофуражний	Шестирядний	Ярий	США
Betzes	Пивоварний	Дворядний	Ярий	Німеччина
O.A.C.21	Пивоварний, зернофуражний	Шестирядний	Ярий	Канада
Klages	Пивоварний	Дворядний	Ярий	США

фікації сортів та воно більш ефективне при встановленні внутрішньосортного поліморфізму.

Не останню роль при виборі типу маркерів відіграє і собівартість проведення аналізу, яка має суттєве значення при проведенні таких рутинних процедур, як ідентифікація генотипів. Для ефектної процедури ідентифікації генотипів певної культури необхідно попередньо підібрати комбінацію маркерів, що забезпечують виявлення найбільшого поліморфізму у даному наборі сортів та в сукупності дозволяють з високою імовірністю диференціювати генотипи. Отже, метою даного дослідження була розробка системи ідентифікації сортів ярого ячменю на основі AFLP-маркерів.

Матеріали і методи. У дослідженні використовували 19 сортів переважно ярого ячменю вітчизняної та закордонної селекції з колекції Української лабораторії якості та безпеки продукції (УЛЯБП) АПК. Колекцію створено на основі зразків, наданих Банком генетичних ресурсів рослин України (Харків) та National Small Grains Collection – NSGC (США) з метою подальшого її використання у дослідженнях, присвячених генетиці ячменю. Оскільки ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) – самозапильний вид, більшість сортів цієї культури є гомозиготними лініями. Попереднє обстеження наданих зразків сортів ярого ячменю показало їх мономорфність за морфологічними ознаками, а також ідентичність спектрів 20 зерен для кожного сорту за ISSR-маркерами (результати не наведено). Колекція УЛЯБП АПК створювалася методом відбору у кожному з сортів однієї рослини для подальшого її самозапилення та розмноження для створення лінійного матеріалу.

Для аналізу відбирали сорти, що можуть бути найбільш генетично віддаленими (табл. 1). Бралися до уваги такі характеристики сортів, як морфологія колосу (дворядність – шестирядність), походження (країна селекційного центру), господарський напрямок використання. Більша частина сортів належать до пивоварного напрямку використання. Зернофуражний напрямок представлено п'ятьма сортами.

Виділення ДНК із тканин листків ярого ячменю. Використана у даному дослідженні методика виділення ДНК з рослинних тканин є модифікацією СТАВ-метода і запропонована Keb-Llanes et al. [24]. Вибір саме цього протоколу

обумовлений тим, що він дозволяє отримувати ДНК високої якості, де її фрагменти піддаються мінімальним розривам, тобто отримана ДНК складається з фрагментів якомога більшої довжини. Ця особливість є важливою для успішного застосування методики AFLP.

Методика отримання поліморфних фрагментів методом AFLP для ячменю. Для отримання поліморфних ампліфікованих фрагментів виконувалися процедури згідно з рекомендаціями виробника реактивів «Applied Biosystems» (США) [25]. Процес включав рестрикцію, очищення продуктів рестрикції, лігування, пре-ПЛР та селективну ПЛР. В оригінальній методиці [2] як рестрикційні ендонуклеази використовували EcoRI та MseI. Замість MseI ми використовували TruI, яка є ізошизомером MseI, але дешевша порівняно з нею [25]. Ампліфікацію здійснювали у два етапи: на першому використовували праймери з одним додатковим нуклеотидом на 3'-кінці (EcoRI-A, MseI-C), на другому – праймери мали додатково ще три нуклеотиди на 3'-кінці для більшої селективності полімеразної реакції. EcoRI-A*** праймери для селективної ПЛР несли флуоресцентні барвники R6G* або Tamra* для детекції фрагментів у генетичному аналізаторі. Послідовності адаптерів та праймерів наведено у табл. 2. Оцінку довжини отриманих фрагментів (фрагментний аналіз) здійснювали за допомогою капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі «Applied Biosystems 3130» (США) згідно з рекомендаціями виробника обладнання. Аналіз даних проводили у програмі Gene Mapper v3.7. Для кожної комбінації праймерів вираховували частку поліморфних фрагментів як відношення кількості поліморфних до загальної кількості фрагментів. Цей показник свідчив про рівень поліморфізму, який здатна забезпечувати дана комбінація праймерів. Для селективної ПЛР використовували чотири комбінації праймерів:

MseI-CCTA + EcoRI-AAGG-R6G*	(M-CCTA/E-AAGG)
MseI-CCAC + EcoRI-AAGG-R6G*	(M-CCAC/E-AAGG)
MseI-CCAG + EcoRI-AAGG-R6G*	(M-CCAG/E-AAGG)
MseI-CCAC + Eco RI-AACC Tamra*	(M-CCAC/E-AACC)

Для встановлення характерного для кожного сорту спектра фрагментів до уваги бралися фрагменти довжиною від 50 до 450 п.н. Особливістю AFLP-методу є те, що деякі з піків

(фрагментів) можуть виявитися алельними. Отже, кількість проаналізованих локусів може бути меншою, ніж зазначена кількість поліморфних фрагментів. До аналізу включали лише інтенсивні піки із висотою не менше 100 одиниць флуоресценції.

Аналіз результатів AFLP із використанням алгоритму UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Для встановлення генетичної подібності між об'єктами часто використовують коефіцієнти Дайса або Жаккара [4, 7, 26], проте дані коефіцієнти не враховують випадків одночасної відсутності ознаки в оцінюваного генотипа [26]. В роботі [27] запропоновано використовувати коефіцієнт кореляції Пірсона, що позбавлений описаного недоліку згаданих коефіцієнтів

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}, \quad (1)$$

де \bar{x} , \bar{y} – вибіркові середні.

Розрахунок дистанцій проводився за формулою

$$D = (1 - r) \cdot 100. \quad (2)$$

Для автоматизації обробки результатів користувались програмою «DendroUPGMA» (<http://genomes.uv.cat/UPGMA/>). Програма здійснює кластерний аналіз, застосовуючи UPGMA (парно-груповий незважений метод) [28]. Матриці, отримані за даними аналізу, використовувалися для побудови дендрограми, яка відображає генетичні дистанції між сортами, що аналізувалися AFLP-методом.

Розрахунок генної різноманітності (\hat{H}) для популяції із високою однорідністю проводили за формулою [29]

$$\hat{H} = \frac{N}{N-1} (1 - \sum_{i=1}^n p_i^2), \quad (3)$$

де N – число особин, p_i – частота алеля.

Результати досліджень та їх обговорення. Однією із переваг технології AFLP є можливість застосування досить великої кількості комбінацій праймерів для вивчення поліморфізму, однак не всі комбінації виявляються достатньо інформативними. При виборі комбінацій олігонуклеотидних праймерів нами враховувалися літературні дані. З аналізу заздалегідь було

виключено комбінації пар праймерів, що не забезпечують наявності достатньої кількості поліморфних фрагментів для ячменю [25]. В нашому дослідженні для селективної ПЛР використано три MseI-праймери та два EcoRI-праймери у чотирьох комбінаціях (табл. 3). При аналізі 19 сортів ячменю чотирма обраними комбінаціями праймерів виявлено 126 поліморфних фрагментів, що становило 60 % загальної кількості виявлених (208 фрагментів). Кожна з комбінацій продукувала від 43 до 60 мажорних фрагментів (табл. 3). Середня кількість для чотирьох комбінацій становила 52 фрагменти. Найбільшу частку поліморфних фрагментів забезпечувала четверта комбінація праймерів (MCCAC/E-AACC) – 91 %.

Таблиця 2. Послідовності адаптерів та праймерів (5'→3')

Олігонуклеотид	Послідовність (5'→3')
E-adapter 1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
E-adapter 2	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
M-adapter 1	GAC GAT GAG TCC TGA G
M-adapter 2	TAC TCA GGA CTC AT
EcoRI-A	GAC TGC GTA CCA ATT CA
MseI-C	GAT GAG TCC TGA GTA AC
MseI-CCTA	GAT GAG TCC TGA GTA ACC TA
MseI-CCAC	GAT GAG TCC TGA GTA ACC AC
MseI-CCAG	GAT GAG TCC TGA GTA ACC AG
EcoRI-AAGG-R6G*	GAC TGC GTA CCA ATT CAA GG
EcoRI-AACC-Tamra*	GAC TGC GTA CCA ATT CAA CC

Таблиця 3. Кількість ампліфікованих та поліморфних фрагментів у чотирьох комбінаціях праймерів

Комбінація праймерів	Загальна кількість фрагментів	Поліморфних фрагментів	
		кількість	частка
M-CCTA/E-AAGG	60	36	0,60
M-CCAC/E-AAGG	51	21	0,41
M-CCAG/E-AAGG	54	30	0,56
M-CCAC/E-AACC	43	39	0,91
Середнє	52	31,5	0,62

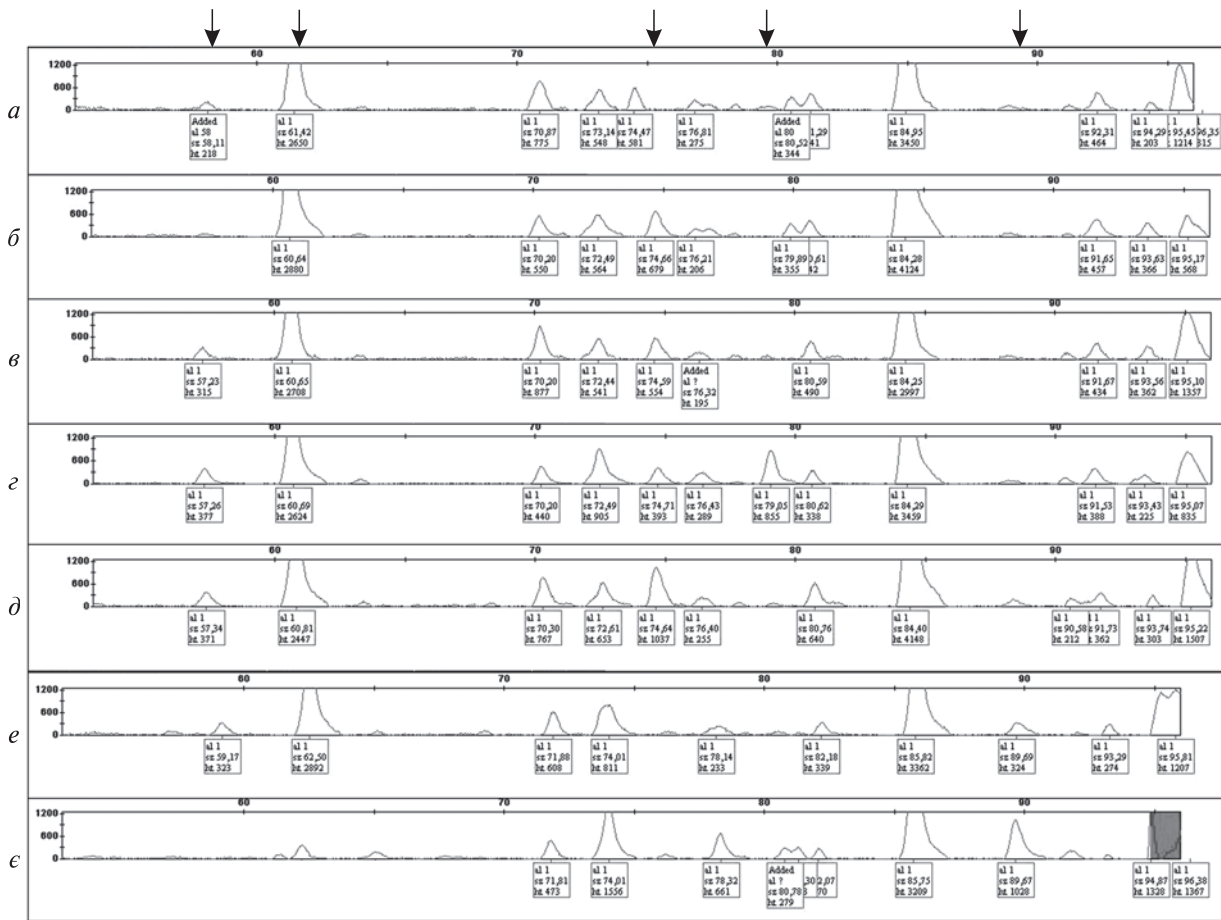


Рис. 1. Фрагмент електрофореграми ампліфікованих фрагментів сортів ячменю з використанням комбінації праймерів М-ССТА/Е-ААGG: а – Селінка, б – Джерело, в – Адагіо, г – Толар, д – Чарівний, е – Реяс, є – Марс. Стрілки вказують на поліморфні фрагменти

На рис. 1 показані фрагменти електрофореграм розподілу продуктів ампліфікації для сортів Селінка, Джерело, Адагіо, Толар, Чарівний, Реяс та Марс, що мали комбінацію праймерів М-ССТА/Е-ААGG.

Ідентифікаційна та диференційна здатність системи ДНК маркерів обумовлена унікальністю та поліморфізмом кожного окремого маркера або фрагмента. З огляду на це аналіз даних щодо сортоспецифічності окремих фрагментів (рідкісні алелі) та генного різноманіття має практичну цінність та свідчить про можливість даної системи ДНК маркерів диференціювати та ідентифікувати сорти.

Виявлено маркерні фрагменти із високою генною різноманітністю (від 0,40 і вище) та фрагменти, що зустрічалися рідко. Рідкісні але-

лі можна використовувати для швидкої ідентифікації генотипів, яким вони притаманні (табл. 4). Такі алелі виявлено для 12 сортів, відповідно 7 сортів не несли унікальних алелів. Разом з тим для створення високоефективної системи генотипування більшої, ніж досліджена, колекції сортів доцільно використовувати маркерні фрагменти із високою генетичною різноманітністю. У табл. 5 наведено значення генної різноманітності для кожного з маркерів.

При аналізі генної різноманітності у сортів цей показник був високим (близько 0,40) за виключенням сорту Husky у комбінації М-ССАС/Е-ААСС ($\bar{H} = 0,19$). Генна різноманітність з урахуванням різноманітності серед фрагментів і сортів складала у комбінаціях: М-ССТА/Е-ААGG – 0,38; М-ССАС/Е-ААGG – 0,37; М-ССАГ/Е-

AAGG – 0,38; M-CCAC/E-AACC – 0,35. Загальна генна різноманітність становила 0,37.

Велика кількість поліморфних фрагментів, яку можна отримати за допомогою AFLP-технології, дозволяє максимально оптимізувати систему ідентифікації сортів ячменю з урахуванням таких параметрів, як комбінація використаних для селективної ПЛР праймерів, генна різноманітність AFLP-алелів, хромосомна локалізація маркерів. Слід використовувати такі комбінації праймерів, що забезпечують найбільшу кількість поліморфних фрагментів. Доцільним є застосування маркерів із високою генною різноманітністю. Локалізація фрагментів є бажаною, але не обов'язковою умовою формування системи маркерів при ідентифікації та диференціації генотипів. Для оптимізації розробленої системи генотипування з метою застосування її в генетико-селекційних дослідженнях картування виявлених поліморфних фрагментів на генетичній карті ячменю дозволить використовувати лише маркери, що є рівномірно розповсюдженими у геномі рослин. Кількість маркерів, розташованих в одній ділянці геному, можна буде скоротити. Виконано кілька робіт, присвячених створенню генетичної карти ячменю на основі AFLP-маркерів [12, 13], проте для використання цих результатів необхідно проводити адаптацію вже створених карт для інших картуючих популяцій та локалізацію на новостворених картах ознак, що становлять інтерес для дослідника [14, 15].

Отримані у даному дослідженні результати профілювання сортів ячменю за AFLP-маркерами переведено у таблиці з двійковим кодом, де 1 відповідає наявності фрагмента певного розміру, 0 – його відсутності. Таке наведення даних необхідне для запису генетичної формули сорту. Критерієм належності того чи іншого зразка ячменю до певного сорту є відповідність набору AFLP-фрагментів, що продукує даний зразок, генетичній формулі. Використані нами комбінації праймерів з успіхом можуть бути застосовані у системі ідентифікації сортів ярого ячменю із високою роздільною здатністю. З цією метою упорядковано дискримінаційні набори, що дозволили розрізнити досліджувані сорти. До першого дискримінаційного набору відібрано 12 маркерів із генною різноманітністю від 0,35 і вище та один маркер із генною різ-

номанітністю 0,28, що отримані із комбінацією праймерів M-CCTA/E-AAGG. До другого дискримінаційного набору відібрано 17 маркерів із генною різноманітністю від 0,35 і вище, що отримані за допомогою двох комбінацій – M-CCAG/E-AAGG та M-CCAC/E-AACC. Генетичні формули сортів за двома дискримінаційними наборами наведено у табл. 6 та 7.

Одним з напрямків застосування ДНК-маркерів є визначення генетичної віддаленості форм для формування селекційних програм і більш

Таблиця 4. Перелік унікальних фрагментів для ідентифікації вивчених генотипів сортів ячменю

Сорт	Комбінація праймерів	Довжина фрагмента за кількістю нуклеотидів
Danuta	M-CCAC/E-AAGG	244
	M-CCAC/E-AACC	327, 336, 355
Оболонь *	–	–
Varke *	–	–
Jersey	M-CCAC/E-AAGG	193
Звершення *	–	–
Цезар *	–	–
Celinka	M-CCAC/E-AAGG	335
	M-CCAC/E-AACC	129, 366
Джерело	–	–
Adagio	M-CCTA/E-AAGG	133, 167, 175
	M-CCAC/E-AAGG	165
Tolar	M-CCTA/E-AGG	223
	M-CCAC/E-AACC	210, 313
Чарівний	M-CCTA/E-AAGG	269, 278
	M-CCAC/E-AACC	108
Pejas	M-CCAC/E-AACC	100
Mars	M-CCTA/E-AAGG	294, 322
	M-CCAC/E-AAGG	172
	M-CCAG/E-AAGG	107
	M-CCAC/E-AACC	323, 375
Husky	M-CCAC/E-AACC	152, 167
Freja *	–	–
Steptoe	M-CCTA/E-AAGG	298
Betzes	–	–
O.A.C.21	M-CCAG/E-AAGG	70, 186
Klages	M-CCAC/E-AAGG	304

* Для даного сорту унікальних фрагментів не виявлено.

Таблиця 5. Генна різноманітність (\hat{H}) AFLP-алелів

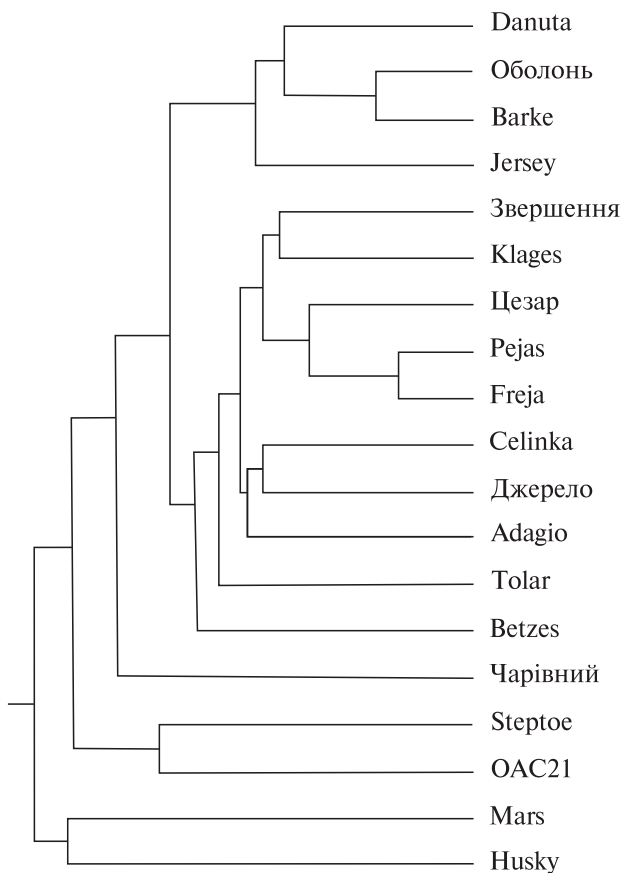
Комбінація праймерів	Фрагмент	Генна різноманітність	Комбінація праймерів	Фрагмент	Генна різноманітність	Комбінація праймерів	Фрагмент	Генна різноманітність	
M-CCTA/E-AAGG	56	0,20		202	0,28	Загальна генна різноманітність для фрагментів	368	0,20	
	59	0,20		205	0,41		373	0,20	
	62	0,20		208	0,20				
	73	0,49		220	0,20				
	75	0,11		244	0,11				
	79	0,41		276	0,11				
	80	0,11		280	0,28		M-CCAC/E-AACC	53	0,28
	82	0,28		290	0,11			67	0,11
	133	0,11		304	0,11			88	0,49
	135	0,28		309	0,35			89	0,49
	151	0,28		313	0,35			93	0,41
	162	0,28		325	0,28			100	0,11
	167	0,11		326	0,28			105	0,11
	175	0,11		335	0,11			108	0,11
	192	0,41						113	0,11
	223	0,11		Загальна генна різноманітність для фрагментів	0,22			124	0,11
	246	0,35						129	0,11
	252	0,41		M-CCAG/E-AAGG	59		0,49	133	0,46
	263	0,53			63		0,20	152	0,11
	269	0,11			64		0,35	154	0,28
	273	0,20			69		0,20	160	0,20
	278	0,11			70		0,11	163	0,46
	281	0,28			76		0,11	167	0,11
	294	0,11			95		0,51	174	0,20
	298	0,11			107		0,11	179	0,20
	300	0,41			111		0,20	196	0,41
	303	0,53			121		0,28	204	0,11
	322	0,11			124		0,28	210	0,11
	337	0,51			153		0,35	242	0,11
	342	0,49			182		0,11	268	0,28
	345	0,53			186		0,11	276	0,20
	349	0,35			189		0,11	291	0,46
	350	0,20			192		0,28	301	0,11
	354	0,20			193		0,11	313	0,11
	362	0,11			206		0,51	319	0,20
					210		0,28	323	0,11
Загальна генна різноманітність для фрагментів	0,26		216	0,35	324	0,20			
			217	0,51	327	0,11			
M-CCAC/E-AAGG	75	0,20	223	0,20	336	0,11			
	140	0,28	227	0,35	355	0,11			
	165	0,11	229	0,20	362	0,35			
	169	0,35	280	0,49	366	0,11			
	172	0,11	287	0,11	370	0,35			
	183	0,20	291	0,20	375	0,11			
	188	0,28	294	0,20	381	0,41			
					Загальна генна різноманітність для фрагментів	0,22			

Таблиця 6. Застосування дискримінаційного набору AFLP-маркерів на основі комбінації праймерів M-CCTA/E-AAGG для диференціації сортів ячменю

Сорт ячменю	M-CCTA/E-AAGG												
	73	79	82	192	246	252	263	300	303	337	342	345	349
Danuta	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Оболонь	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
Varke	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Jersey	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
Звершення	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Цезар	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
Celinka	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
Джерело	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
Adagio	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Tolar	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
Чарівний	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
Rejas	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Mars	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1
Husky	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
Freja	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Step toe	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1
Betzes	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
O.A.C.21	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1
Klages	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1

Таблиця 7. Застосування дискримінаційного набору AFLP-маркерів на основі комбінацій праймерів M-CCAG/E-AAGG+M-CCAC/E-AACC для диференціації сортів ячменю

Сорт ячменю	M-CCTA/E-AAGG										M-CCAC/E-AACC						
	59	64	95	153	206	216	217	227	280	373	93	133	163	196	291	362	381
Danuta	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
Оболонь	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
Varke	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
Jersey	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Звершення	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
Цезар	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
Celinka	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
Джерело	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
Adagio	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
Tolar	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
Чарівний	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
Rejas	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
Mars	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
Husky	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Freja	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
Step toe	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
Betzes	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
O.A.C.21	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1
Klages	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1



5

Рис. 2. Дендрограма сортів ячменю, побудована із використанням AFLP-маркерів, отриманих за допомогою чотирьох комбінацій праймерів

обґрунтованого підбору пар для гібридизації. Результати, представлені у двійковій системі, використані нами для розрахунку генетичних дистанцій із подальшою кластеризацією сортів парно-груповим незваженим методом та побудовою дендрограми. Цей метод вказує на ступінь генетичної подібності сортів та певною мірою може відображати їх філогенетичні зв'язки. На рис. 2 наведено дендрограму, що поєднує дані за всіма чотирма комбінаціями праймерів. На отриманій дендрограмі сорти Danuta, Оболонь, Barke, Jersey займають близьке положення. Так само кластери складають Звершення, Klages, Цезар, Freja, Pejas та Celinka, Джерело, Adagio, що свідчить про спільне походження цих сортів. Сорти Mars, Husky, OAC-21 та Steptoe займають відокремлене положення. Таке розташування

цих сортів добре відображає їх філогенетичне походження, оскільки вони є шестирядними і мають комплекс ознак кормової культури. Таким чином, наші результати підтверджують здатність молекулярних маркерів, зокрема AFLP, відображати філогенетичні зв'язки між більш віддаленими групами, наприклад між екотипами.

Літературні дані свідчать про численні спроби пошуку філогенетичних зв'язків між сортами, видами, екотипами і т.д. за допомогою кластерного аналізу та побудови дендрограм на основі молекулярних маркерів (RFLP, RAPD, SSR), і AFLP-маркери тут не стали винятком. Проте часто дані, отримані за допомогою молекулярних маркерів, не відповідають або слабо корелюють із даними про походження тих чи інших біологічних груп [4, 5]. Групування на основі молекулярних маркерів, у тому числі і AFLP, краще відображає філогенетичні зв'язки для більш віддалених груп, наприклад екотипів, ніж для більш споріднених [4]. На нашу думку, однією з причин слабкої кореляції між даними про походження та даними генетичної подібності, отриманими на основі молекулярних маркерів, є неврахування закономірностей еволюціонування геномів при утворенні нової біологічно відокремленої групи рослин. Очевидно, що таке відокремлення супроводжується не рівномірними мутаційними процесами в геномі, а невеликою кількістю мутацій в певних ділянках геному, що при застосуванні методів побудови дендрограм не враховується.

За даними Qi et al. [3], критичним для виявлення високого поліморфізму за допомогою AFLP-маркерів є швидше вибір саме комбінації праймерів, що застосовується, ніж вибір генотипу, що аналізується. Тому при аналізі інших сортів ячменю, не залучених до даного дослідження, слід очікувати на ефективну їхню ідентифікацію за допомогою розробленої нами системи.

Результатом даної роботи є створення надійної та високодиференційної системи генотипування сортів ячменю на основі AFLP-маркерів. Запропоновано два дискримінаційних набори, перший з яких включає оцінку за 13 маркерами та генерується за допомогою одної комбінації селективних праймерів, другий дискримінаційний набір включає 17 маркерів

та генерується із використанням двох комбінацій праймерів. Показано, що застосування маркерів для виявлення філогенетичних зв'язків придатне при встановленні спорідненості між біологічними групами – екотипами, групами сортів тощо.

Zh.V. Vdovychenko, K.S. Sytnyk,
I.Yu. Stupak, V.G. Spyrydonov, S.D. Melnychuk,
M.D. Melnychuk, M.F. Parii

National University of Bioresources and
Prirodokoristuvannya of Ukraine, Kyiv
E-mail: pariimyroslov@gmail.com

MOLECULAR-GENETIC POLYMORPHISM OF
BARLEY (*HORDEUM VULGARE L.*) CULTIVARS
DETECTED WITH AFLP METHOD

Analysis of molecular-genetic polymorphism of barley varieties was performed using AFLP-method. A system for identification and differentiation of barley varieties based on AFLP-markers was developed. Results of testing for 19 varieties indicate a high differential ability of the developed system. Identification of varieties can be conducted using one of two proposed discriminatory sets of AFLP-markers. Based on the calculated genetic distances a dendrogram of phylogenetic relations between the varieties was constructed. The dendrogram revealed a separated origin of varieties of malting and feed directions.

Ж.В. Вдовиченко, К.С. Сытник,
И.Ю. Ступак, В.Г. Спиридонов, С.Д. Мельничук,
М.Д. Мельничук, М.Ф. Парий

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИМОРФИЗМ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM
VULGARE L.*), ВЫЯВЛЕННЫЙ МЕТОДОМ AFLP

Проанализирован молекулярно-генетический полиморфизм сортов ячменя методом AFLP. Разработана система идентификации и дифференциации сортов ячменя на основе AFLP-маркеров. Результаты апробации на 19 сортах свидетельствуют о высокой дифференцирующей способности разработанной системы. Идентификация сортов может проводиться с использованием одного из двух предложенных дискриминационных наборов AFLP-маркеров. На основе рассчитанных генетических дистанций построена дендрограмма филогенетических связей между сортами, выявившая обособленное происхождение сортов пивоваренного и кормового направлений.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // ИОГен им Н.И.Вавилова. Лаборатория сравнительной генетики животных.

Электронный журнал, <http://lab-cga.ru/articles/Jornal01/Statia1.htm>

2. Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acids Res. – 1995. – 23, № 21. – P. 4407–4414.
3. Qi X., Lindhout P. Development of AFLP markers in barley // Mol. Gen. Genet. – 1997. – 254. – P. 330–336.
4. Schut J.W., Qi X., Stam P. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley // Theor. Appl. Genet. – 1997. – 95. – P. 1161–1168.
5. Ellis R. P., McNicol J. W., Baird E. et al. The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley // Mol. Breed. – 1997. – 3, № 5. – P. 359–369.
6. Eckstein P., Hay D., Rossnagel B., Scoles G. Molecular characterization of barley for variety description and identification // Proc. 18th North American Barley Researchers Workshop and 4th Canadian Barley Symposium (July 17–20, 2005). – Alberta, 2005. – P. 148.
7. Turpeinen T., Vanhala T., Nevo E., Nissilä E. AFLP genetic polymorphism in wild barley (*Hordeum spontaneum*) populations in Israel // Theor. Appl. Genet. – 2003. – 106, № 7. – P. 1333–1339.
8. Assefa A., Labuschagne M.T., Viljoen C.D. AFLP analysis of genetic relationships between barley (*Hordeum vulgare L.*) landraces from north Shewa in Ethiopia // Conserv. Genet. – 2007. – 8, № 2. – P. 273–280.
9. Zhu J., Gale M. D., Quarrie S. et al. AFLP markers for the study of rice biodiversity // Theor. Appl. Genet. – 1998. – 96. – P. 602–611.
10. Murtaza N. Cotton genetic diversity study by AFLP markers // Electron. J. Biotechnol. – 2006. – 9, № 4.
11. Jacobs M.M.J., van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G.A.A. et al. AFLP analysis reveals a lack of phylogenetic structure within *Solanum* section *Petota* // BMC Biol. – 2008. – № 8. – P. 145.
12. Qi X., Stam P., Lindhout P. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley // Theor. Appl. Genet. – 1998. – 96. – P. 376–384.
13. Mano Y., Kawasaki S., Takaiwa F., Komatsuda T. Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgare L.*) cross ‘Azumamugi’ × ‘Kanto Nakate Gold’ using a simple and efficient amplified fragment-length polymorphism system // Genome. – 2001. – 44. – P. 284–292.
14. Pozzi C., di Pietro D., Halas G. et al. Integration of a barley (*Hordeum vulgare*) molecular linkage map with the position of genetic loci hosting 29 developmental mutants // Heredity. – 2003. – 90. – P. 390–396.
15. Yin X., Stam P., Dourleijn C. J., Kropff M. J. AFLP

- mapping of quantitative trait loci for yield-determining physiological characters in spring barley // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – **99**, № 1/2. – P. 244–253.
16. *Alonso-Blanco C., Peeters A.J.M., Koornneef M. et al.* Development of an AFLP based linkage map of *Ler*, *Col* and *Cvi Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a *Ler/Cvi* recombinant inbred line population // *Plant J.* – 1998. – **14**, № 2. – P. 259–271.
 17. *Eckstein P., Hay D., Rosnagel B., Scoles G.* An AFLP derived tightly linked marker for true loose smut resistance (Un8) // Proc. 18th North American Barley Researchers Workshop and 4th Canadian Barley Symposium (July 17–20, 2005). – Alberta, 2005. – P. 65.
 18. *Altinkut A., Kazan K., Gozukirmizi N.* AFLP marker linked to water-stress-tolerant bulks in barley (*Hordeum vulgare L.*) // *Genet. and Mol. Biol.* – 2003. – **26**, № 1. – P. 77–82.
 19. *Shan X., Blake T.K., Talbert L.E.* Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – **98**, № 6/7. – P. 1072–1078.
 20. *Wang B., Li Ch.-Yo., Zheng H.-G. et al.* Primary study of rice AFLP analysis – Optimization of reaction conditions and analysis of thermo-sensitive genetic male sterile rice allelic mutant lines // *Acta Bot. Sin.* – 1999. – **41**, № 5. – P. 502–507.
 21. *Сиволан Ю.М., Календарь Р.Н.* Исследование внутривидового полиморфизма и идентификация генотипов ячменя (*Hordeum vulgare L.*) // *Цитология и генетика.* – 1998. – **32**, № 6. – С. 35–41.
 22. *Бальвинская М.С., Ruder M., Сиволан Ю.М.* SSRP-анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортов ярового ячменя южноукраинской селекции // *Докл. Рос. акад. с.-х. наук.* – 2001. – № 5. – С. 3–7.
 23. *Brik A.F., Kalendar R.N., Stratula O.R., Sivolap Yu.M.* IRAP and REMAP analyses of barley varieties of Odessa breeding // *Cytology and Genetics.* – 2006. – **40**, № 3. – С. 24–33.
 24. *Keb-Llanes M., Gonzalez G., Chi-Manzanero B., Infante D.* A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2002. – **20**, № 3. – P. 299a–299e.
 25. *AFLP Plant Mapping. Protocol.* Applied Biosystems, USA. – 2007
 26. *Ким Дж.-О., Мьюллер Ч.У., Клекка У.Р. и др.* Факторный, дискриминантный и кластерный анализ / Под ред. И.С. Енюкова. – М.: Финансы и статистика, 1989. – 215 с.
 27. *Garcia-Vallve S., Palau J., Romeu A.* Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // *Mol. Biol. Evol.* – 1999. – **16**, № 9. – P. 1125–1134
 28. *Sneath P.H.A., Sokal R.R.* Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. – San Francisco : WH Freeman and Co, 1973. – 573 p.
 29. *Хедрик Ф.* Генетика популяций. – М.: Техносфера, 2003. – 592 с.

Надійшла 28.03.13