

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ – НАЦІОНАЛЬНИЙ
ЦЕНТР НАСІННЄЗНАВСТВА ТА СОРТОВИВЧЕННЯ**

На правах рукопису

ВЕНГЕР АНДРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 633.791:575.113

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ЗАСАДИ ВИЗНАЧЕННЯ
ТИПУ СОРТУ, СТАТІ ТА УРАЖЕННЯ
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО**

03.00.20 – біотехнологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник

Волкова Наталія Едуардівна

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник

Одеса – 2015

ЗМІСТ

	Стор.
СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ В ПОКРАЩЕННІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	14
1.1. Біологічна характеристика хмелю звичайного.....	14
1.2. Характеристика і функції халконсинтаз та продуктів їх каталізу; гени, що кодують халконсинтази.....	16
1.2.1. Халконсинтази хмелю звичайного.....	17
1.2.2. Похідні халконсинтаз.....	19
1.2.3. Гени, що кодують халконсинтази.....	21
1.3. Біологічна характеристика статі хмелю.....	22
1.4. Патогенез бактеріального раку у хмелю.....	24
1.5. Біотехнології в генетиці, селекції та розсадництві хмелю.....	27
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	36
2.1. Матеріал досліджень.....	36
2.1.1. Сорти хмелю звичайного.....	36
2.1.2. Штам <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
2.1.3. Нуклеотидні послідовності.....	39
2.2. Методи досліджень.....	40
2.2.1. Вилілення <i>A. tumefaciens</i>	40
2.2.2. Культура апікальних меристем <i>in vitro</i>	40
2.2.3. Виділення тотальної ДНК з рослин.....	42
2.2.4. Виділення ДНК з <i>A. tumefaciens</i>	42
2.2.5. Оцінка якості та кількості виділеної ДНК.....	43
2.2.6. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції	43
2.2.7 Гель-електрофорезний розподіл продуктів ампліфікації	47

2.2.8	Візуалізація продуктів ПЛР.....	47
2.2.9	Визначення розмірів продуктів ампліфікації.....	48
2.2.10	Біоінформатичні методи.....	48
2.2.11	Математичні методи.....	49
2.2.12	Загальна схема роботи.....	50
РОЗДІЛ 3	ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ, ДОБІР ТА ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> ЗРАЗКІВ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО, ВІЛЬНИХ ВІД <i>A. tumefaciens</i>	52
3.1.	Біоінформатичне дослідження генів <i>ipt</i> та <i>virD2</i> Ті- плазміді	52
3.2.	Молекулярно-генетичне дослідження генів <i>ipt</i> та <i>virD2</i> Ті-плазміді	56
3.3.	Культивування хмелю звичайного <i>in vitro</i>	59
РОЗДІЛ 4	ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ХАЛКОНСИНТАЗИ	63
4.1	Вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів, що коднують халконсинтази.....	63
4.2	Анотація та визначення сайтів праймування.....	66
4.3	Поліморфізм розміру генів, що коднують халконсинтази, у сортів хмелю звичайного української селекції.....	69
РОЗДІЛ 5	ЗВ'ЯЗОК МІЖ ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ХАЛКОНСИНТАЗИ, ТА РІВНЕМ ГІРКИХ РЕЧОВИН У ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО.....	88
РОЗДІЛ 6	ДОСЛІДЖЕННЯ СТАТІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ.....	97
РОЗДІЛ 7	АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	104

ВИСНОВКИ.....	114
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	117
ДОДАТОК.....	133

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
кДа	кілодальтон
кДНК	комплементарна ДНК
мРНК	матрична рибонуклеїнова кислота
МС	мікросателітні
ПАА	поліакріламід
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
п.н.	пари нуклеотидів
рДНК	рибосомна ДНК
РНКаза	рибонуклеаза
Ті-плазмід (tumor inducing)	пухлиноутворююча плазмід
Т-ДНК	частина Ті-плазмиди, індукуюча розвиток пухлини
т.п.н.	тисяча пар нуклеотидів
AFLP	(Amplified fragment length polymorphism) – поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів
CHS_H1	(chalcone synthase) халконсинтаза 1
<i>chs_H1</i>	ген, що кодує халконсинтазу 1
CHS2	халконсинтаза 2
<i>chs2</i>	ген, що кодує халконсинтазу 2
CHS3	халконсинтаза 3
<i>chs3</i>	ген, що кодує халконсинтазу 3
CHS4	халконсинтаза 4
<i>chs4</i>	ген, що кодує халконсинтазу 4
EDTA	(ethylenediaminetetraacetic acid) – етилендіамінтетраоцтова кислота
ISSR	(Inter-Simple Sequence Repeat) – послідовності між

	простими повторами
NCBI	(National Centre for Biotechnology Information) Національний центр біотехнологічної інформації
RAPD	(Random Amplified Polymorphic DNA) – довільно ампліфікована поліморфна ДНК
VPS	(valerophenone synthase) – валерофенонсинтаза
<i>vps</i>	ген, що кодує валерофенонсинтазу
<i>vir</i>	ген вірулентності Ті-плазмід
SCAR	(Sequence Characterized Amplified Region) – ампліфікований регіон з охарактеризованою нуклеотидною послідовністю
SDS	(Sodium Dodecylsulfate) – додецилсульфат натрію
SNP	(Single Nucleotide Polymorphisms) – однонуклеотидний поліморфізм
STS	(Sequence-Tagged Sites) – послідовність мічених сайтів
SSR	(Simple Sequence Repeat) – повтор простої послідовності
QTL	(Quantative Trait Locus) – локус кількісної ознаки
w/v	(weight per volume) – маса/об'єм

ВСТУП

Актуальність. Серед пріоритетних напрямів розвитку науки в XXI столітті біотехнологія визнана однією з основних. У зв'язку з ростом чисельності населення та активним зменшенням площ сільськогосподарських угідь, особливого значення набувають агробіотехнології, зокрема молекулярні біотехнології на основі молекулярних маркерів [72].

Хмелярство – важлива складова економіки багатьох країн світу, в т.ч. і України [12]. Хміль звичайний *Humulus lupulus* L. є джерелом найбільш специфічної, незамінної та найдорожчої сировини для пивоваріння, але завдяки наявності унікальних біоактивних компонентів хміль використовують також у харчовій, медичній та фармакологічній промисловості [25].

Важливість галузі хмелярства для економіки України вимагає використання сучасних молекулярних біотехнологій для створення конкурентоспроможних сортів, що в свою чергу потребує розширення в Україні фундаментальних досліджень з геномики хмелю [4]. Створення високоякісних та конкурентоспроможних сортів обумовлено, зокрема, можливістю виявлення типу сорту на ранніх етапах онтогенезу у зразків, які у подальшому залучатимуться у селекційний процес, а також виявлення статі зразків та детекція збудника бактеріального раку рослин *Agrobacterium tumefaciens* [1, 9].

При попередньому тестуванні зразків хмелю звичайного за даними ознаками виключається накопичення зайвого (баластного) садивного матеріалу [1]. Тому розробка молекулярної біотехнології визначення типу сорту, статі та ураження *A. tumefaciens* хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) є актуальною та має як наукове, так і практичне значення.

Найціннішою частиною хмелю звичайного є шишки завдяки наявності у них комплексу специфічних смол, поліфенольних сполук, ефірних олій і

біологічно активних речовин, які мають не тільки смакові і ароматичні, але і антибіотичні, антиокислювальні та лікувальні властивості [18, 27, 33, 35]. Головна мета селекції хмелю звичайного полягає в покращенні вмісту та якості вторинних метаболітів, що акумулюються в лупулинових зернах шишок [12, 77]. Тому актуальним є дослідження поліморфізму генів, пов'язаних з біосинтезом цих речовин, та використання молекулярних маркерів цих генів у селекції хмелю (для добору за допомогою маркерів, marker-assisted selection, MAS) [37].

У промислових цілях культивують жіночі рослини хмелю звичайного, які розмножують вегетативно [7, 13]. Чоловічі рослини використовують тільки в селекції для проведення гібридизації. Визначення статі рослин хмелю фенотипово проводиться на другий рік росту [13]. Тому важливим для селекційної практики є питання раннього тестування статі зразка перед садінням.

Необхідним є вирішення проблеми розмноження селекційного матеріалу хмелю звичайного, вільного від фітопатогенів, зокрема, збудника бактеріального раку рослин *A. tumefaciens*. Використання для цих цілей хіміо- та термотерапії не забезпечує повного позбавлення від збудників [66]. Розробка та використання молекулярних біотехнологій детекції фітопатогенів дозволяє проводити раннє та надійне виявлення ураження *A. tumefaciens*.

Таким чином, розробка біотехнологічних засад для добору здорових зразків хмелю звичайного для подальшого клонального мікророзмноження та їх комплексної оцінки за складом і рівнем цінних вторинних метаболітів, статтю та наявністю захворювання на бактеріальний рак рослин на основі дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму певних генів та локусів геному хмелю звичайного є актуальною як з точки зору теоретичного аналізу, так і практичної значущості. Дані біотехнологічні засади обумовлюють підвищення ефективності селекції хмелю звичайного через

скорочення витрат праці, коштів, матеріалів, площ (в теплицях або полі) та часу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відділі загальної та молекулярної генетики Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (до квітня 2012 р. – відділ молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру в рослинництві) за завданнями «Розробити сучасні біотехнологічні методи оцінки різноманіття генофонду хмелю України з метою ідентифікації генотипів, їх збереження і використання в селекційному процесі» НТП 20 «Хміль» (№ держреєстрації 0109U001140) та «Маркування генів агрономічно важливих ознак хмелю звичайного та розробка біотехнологічних прийомів одержання нових соматоклонів» НТП 23 «Сільськогосподарська біотехнологія 2011-2015 рр.» (№ держреєстрації 0111U006105).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи полягала в розробці молекулярно-біотехнологічних засад комплексної оцінки зразку хмелю за типом сорту, статтю, наявністю ураження *A. tumefaciens* та доборі вільного від *A. tumefaciens* садивного матеріалу з певними характеристиками.

Для досягнення поставленої мети визначено такі задачі:

- 1) молекулярно-генетичне та біоінформатичне дослідження поліморфізму генів вірулентності і патогенності (*virD2* та *ipt*) Ті-плазмід *A. tumefaciens*;
- 2) добір зразків сортів хмелю звичайного, вільного від *A. tumefaciens*, в умовах *in vitro*;
- 3) біоінформатичне дослідження поліморфізму генів, що кодують халконсинтази *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps*, з бази даних GenBank Національного центру біотехнологічної інформації (National Centre for Biotechnology Information, NCBI);

- 4) дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, сортів хмелю звичайного української селекції;
- 5) виявлення зв'язку поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, та типу сорту хмелю звичайного;
- 6) молекулярно-генетичний аналіз регіонів статевих хромосом, валідація статеспецифічних маркерів в колекції сортів та чоловічих зразків хмелю звичайного української селекції;
- 7) доповнення генетичних ідентифікаційних формул сортів хмелю звичайного української селекції, в яких відображено алельний склад мікросателітних локусів, даними щодо генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps*.

Об'єкт дослідження: молекулярно-біотехнологічні особливості оцінки хмелю звичайного за типом сорту, статтю та наявністю ураження бактеріальним раком.

Предмет дослідження: поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, і локусів, пов'язаних зі статтю, сортів хмелю звичайного та генів вірулентності і патогенності Ті-плазміді *A. tumefaciens*.

Методи дослідження: методи культури тканин *in vitro* (метод апікальних меристем) використовували для введення в культуру *in vitro* зразків хмелю звичайного; біоінформатичні методи (вирівнювання нуклеотидних послідовностей, анотація генів, кластерний аналіз) використовували для дослідження нуклеотидних послідовностей, отриманих з бази даних GenBank NCBI; молекулярно-генетичні методи (екстракція та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), гель-електрофорез продуктів ампліфікації) використовували для дослідження поліморфізму ізольованої ДНК; математичні методи (бут-стреп аналіз, дослідження залежності між ознаками за коефіцієнтом рангової кореляції Спірмана) використовували для подальшого дослідження нуклеотидних

послідовностей, отриманих з бази даних GenBank NCBI, побудови дендрограм та визначення залежності між поліморфізмом генів, що кодують халконсинтази (*chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps*), та типом сорту хмелю звичайного; мікробіологічний метод (ізоляція культури клітин на живильному середовищі) використовували для виділення чистої культури *A. tumefaciens*; мікроскопію (фарбування клітин за Грамом) використовували для первинної візуальної ідентифікації клітин збудника бактеріального раку рослин *A. tumefaciens*.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проаналізовано поліморфізм різних регіонів всіх генів, що кодують халконсинтази, *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps* у сортів хмелю звичайного української селекції; здійснено анотацію генів *chs2*, *chs3* та *chs4* хмелю звичайного; розроблено підхід для оцінювання типу сорту хмелю звичайного за допомогою молекулярних маркерів; досліджено можливість визначення статі за даними поліморфізму мікросателітного локусу H1AGA7 та регіону Y-хромосоми у зразків хмелю звичайного української селекції; проведено валідацію молекулярних маркерів для виявлення збудника бактеріального раку рослин *A. tumefaciens*.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено молекулярно-біотехнологічні засади комплексної оцінки, яка дозволяє виявити молекулярно-генетичними методами тип сорту, стать зразка та наявність збудника бактеріального раку рослин у хмелю звичайного.

Особистий вклад здобувача. Автором проведено літературний аналіз за темою дисертації; виділено ДНК з тканин 28 сортів і чоловічих зразків хмелю звичайного української селекції, та клітин штаму *A. tumefaciens*, виділеного з корончатого галу хмелю звичайного; добрані та опрацьовані маркери для виявлення *A. tumefaciens*, статі та дослідження поліморфізму генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного (*chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps*); проведено біоінформатичний

аналіз генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного та *virD2* і *ipt* генів Ті-плазмиди на основі нуклеотидних послідовностей, отриманих з бази даних GenBank NCBI; встановлено можливість виявлення типу сорту за розробленими молекулярними маркерами; добрано та введено в культуру *in vitro* 197 зразків хмелю звичайного, вільного від *A. tumefaciens*.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження представлено на VI Міжнародній конференції «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (Геном рослин VI)» (Україна, Одеса, 2010); VII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології». (Україна, Львів, 2011); VI Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Україна, Алушта, 2011); Перший міжнародній науково-практичній конференції «Стан і перспективи формування сортових рослинних ресурсів в Україні» (Україна, Київ, 2012); Міжнародній науково-практичній конференції «Перспективи розвитку рослинницької галузі в сучасних економічних умовах» (Україна, Скадовськ, 2013); II Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології» (Україна, Київ, 2013); IX Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Україна, Умань, 2014); Global genome biodiversity network international conference on biodiversity biobanking (Сполучене Королівство Велика Британія, Лондон, 2014); Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур» (Україна, Одеса, 2014).

Публікації. Основні результати дисертаційних досліджень висвітлено у 17 наукових працях, з яких шість статей (п'ять у фахових виданнях), Деклараційний патент України на корисну модель, дев'ять тез доповідей на наукових конференціях та методичні рекомендації.

Структура та об'єм дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів, чотирьох розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури та додатку. Повний обсяг становить 140 сторінок машинописного тексту, включаючи 14 таблиць і 26 рисунків. Список використаної літератури включає 131 джерело. Додаток включає 8 сторінок.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ В ПОКРАЩЕННІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (огляд літератури)

1.1. Біологічна характеристика хмелю звичайного

Хміль європейський або звичайний *Humulus lupulus* L., який має найбільше виробниче значення, є представником роду *Humulus* родини *Cannabaceae* порядку *Urticales* підкласу *Hamamelididae* класу *Magnoliopsida* відділу *Magnoliophyta*. До роду *Humulus* відносяться також хміль американський *H. americanus* Rydb., хміль серцеподібний *H. cordifolius* Mig. та хміль японський *H. japonicas* Sieb. et. Zucc. Вид *H. lupulus* L. має п'ять ботанічних підвидів: var. *cordifolius* (головним чином розповсюджений в Японії), var. *pubescens* та var. *neomexicanus* (більш розповсюджені в Америці), var. *lupuloides* (розповсюджений переважно в Європі), var. *lupulus* (найбільш розповсюджений в Європі та Північній Америці) [12].

H. lupulus L. росте по всій земній кулі, однак найбільше представлений у помірних широтах [94, 97]. Серед дослідників немає єдиної думки щодо батьківщини хмелю звичайного. Одні стверджують, що хміль звичайний – дикоросла рослина, широко розповсюджена у Західній Європі, інші вважають, що ця рослина здичавіла тут, а його батьківщиною є Сибір, Середня Азія та Північна Америка [80, 95].

Рослини хмелю звичайного мають наземну та підземну частини, причому тільки підземна частина є багаторічною. Наземна частина складається з однорічних пагонів, що виростають щорічно з бруньок, котрі за вегетацію проходять повний цикл розвитку, а на зиму відмирають.

Хміль європейський – дводомна рослина (іноді – однодомна), звичайно диплоїдна з $2n = 20$. Встановлено такі формули хромосом: жіночий каріотип $18 + XX$; чоловічий каріотип $18 + XY$. Можливо спорадичне виникнення поліплоїдних рослин, зокрема, триплоїдів ($2n = 3x = 27+XXY$, $X/A = 0,67$). Розмір набору базальних хромосом (вміст ДНК моноплоїдного геному, $1Cx$ -value) варіює від 2,3 до 3,1 пг (в межах п'яти вищенаведених ботанічних підвидів). Абсолютна довжина хромосом варіює від $1,75+0,20$ мкм (хромосома 10) до $2,94+0,11$ мкм (хромосома 1) [105]. Розмір геному хмелю звичайного складає 2,05 гігабаз. Геном хмелю звичайного повністю не анотовано [83].

Жіночі суцвіття хмелю звичайного утворюють так звану шишку, котра складається з 20-60 густо зібраних мілких квіток. Шишки зібрані в грона по 40-50 штук в кожному. В нижній частині приквітників, переважно з зовнішньої сторони, утворюються лупулінові залозки [12, 119].

Чоловічі суцвіття являють собою сильно розгалужену волоть, на якій зібрані чоловічі квітки. У чоловічих квіток на чашолистках оцвітинах та на пильовиках в невеликій кількості утворюються лупулінові залозки [111].

Лупулінові залозки являють собою залозисті багатоклітинні волоски, утворені з клітин епідермісу. У процесі життєдіяльності хмелю у лупулінових залозках синтезуються смоли та ефірні олії, що виділяються під кутикулу.

В шишках хмелю відома наявність близько 100 гірких речовин, 70 поліфенолів та 320 ароматичних речовин, більшість з яких є похідними ксантогумолу [119]. Через наявність у своєму складі гірких та ароматичних речовин шишки хмелю використовують в броварництві, медицині, харчовій та парфумерній промисловості [67, 123, 126-12].7

Серед усіх сполук, які присутні в шишках, найважливішими для господарства є гіркі речовини, які так само мають велике значення для самого хмелю звичайного: поліфеноли та гіркі кислоти, що відіграють

важливу роль у забарвленні квітки, захисту рослини від ультрафіолетового випромінювання, взаємодії рослини з мікроорганізмами та комахами, фертильності рослин [68, 77]. Гіркі речовини складаються з α - та β -гірких кислот, які надають пиву приємного гіркого смаку та специфічного (пивного) аромату; поліфенольні сполуки поліпшують прозорість суслу і смак пива, сприяють його піноутворенню та піностійкості [69, 117].

Шишки хмелю використовують також для хлібопекарської промисловості при випіканні пшеничного хліба, виробництві безалкогольних напоїв, як консервант плодів і овочів. З гірких речовин хмелю виготовляють лікувальні фармакологічні препарати. Стебла хмелю можна використовувати для виготовлення міцного грубого волокна. Відкриті антионкогенні властивості гірких кислот [42-43, 82, 128].

1.2. Характеристика і функції халконсинтаз та продуктів їх каталізу; гени, що кодують халконсинтази.

Біосинтез гірких речовин обумовлений наявністю специфічних ферментів, зокрема халконсинтаз. Халконсинтаза (від англ. chalcone synthase, CHS, КФ 2.3.1.74) – ключовий фермент синтезу халконів – флавоноїдів з розкритим пірановим кільцем [16].

Халконсинтази відносяться до надродини ферментів полікетидсинтаз. За своєю будовою халконсинтази схожі з простими полікетидсинтазами. Халконсинтази складаються з двох однакових субодиниць розміром 42 – 45 кДа кожна. Всі субодиниці мають активний центр, що каталізує ряд реакцій декарбоксілювання, конденсації і циклізації [44, 86].

Гомологи халконсинтаз відіграють ключову роль у біосинтезі широкого спектру біологічно активних речовин, таких як антимікробні фітоалексини, флавоноїди, які є інгібіторами онтогенезу, обумовлюють

зabarвлення квіток, стійкість до ультрафіолетового випромінювання, репелентні фактори та ін. [21, 38, 39, 46].

Халконсинтази присутні у більшості вищих рослин [45]. Даних про тварин або грибів з халконсинтазними гомологами у літературі не представлено.

У хмелю звичайного існують п'ять видів халконсинтаз: халконсинтаза 1 - CHS_H1, халконсинтаза 2 - CHS2, халконсинтаза 3 - CHS3, халконсинтаза 4 - CHS4 та валерофенонсинтаза - VPS [70, 90].

1.2.1. Халконсинтази хмелю звичайного. Халконсинтази VPS та CHS_H1 каталізують реакції синтезу флорізовалерофенону, 6-ізобутил-4гідрокси-2-пірону та нарінгенін-халкону [14, 81, 123] (рис. 1.1-1.2).

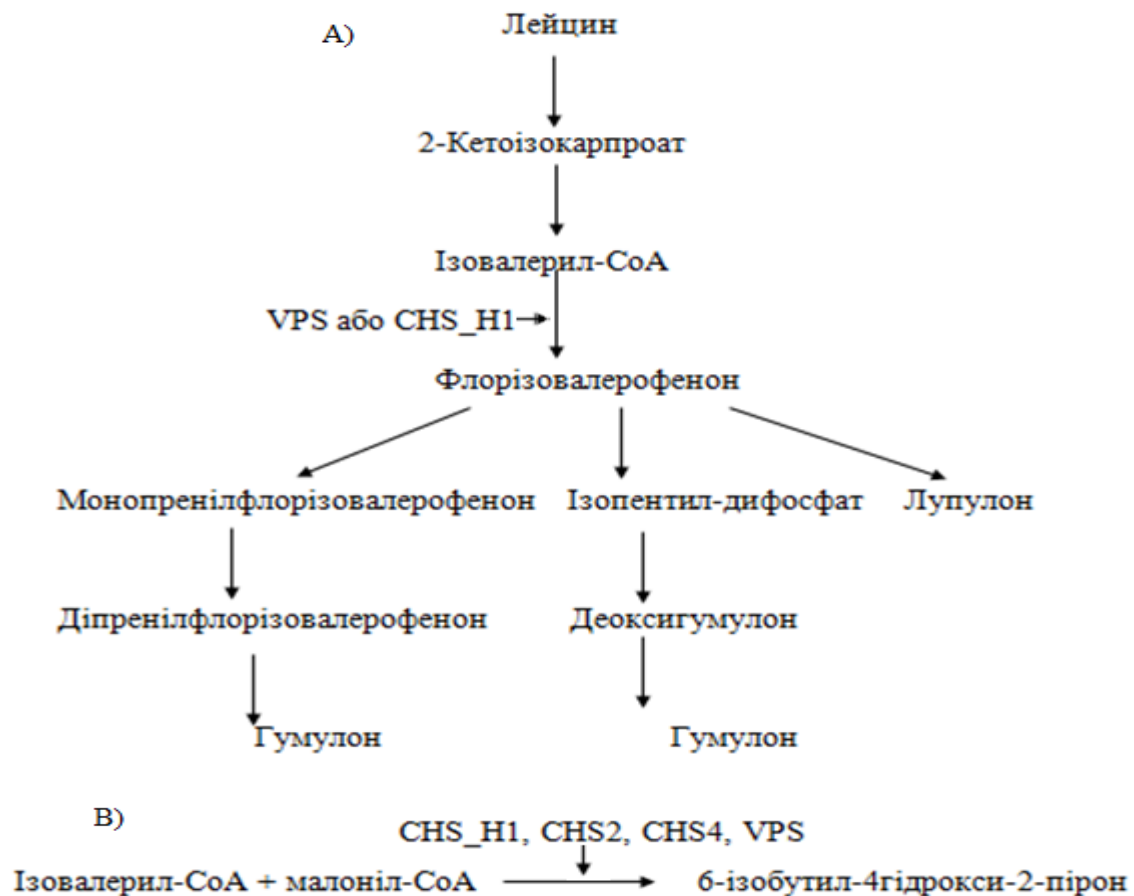


Рис. 1.1. Шляхи синтезу гірких речовин за участю халконсинтаз (А – гумулону та лупулону, В – 6-ізобутил-4гідрокси-2-пірону [82])

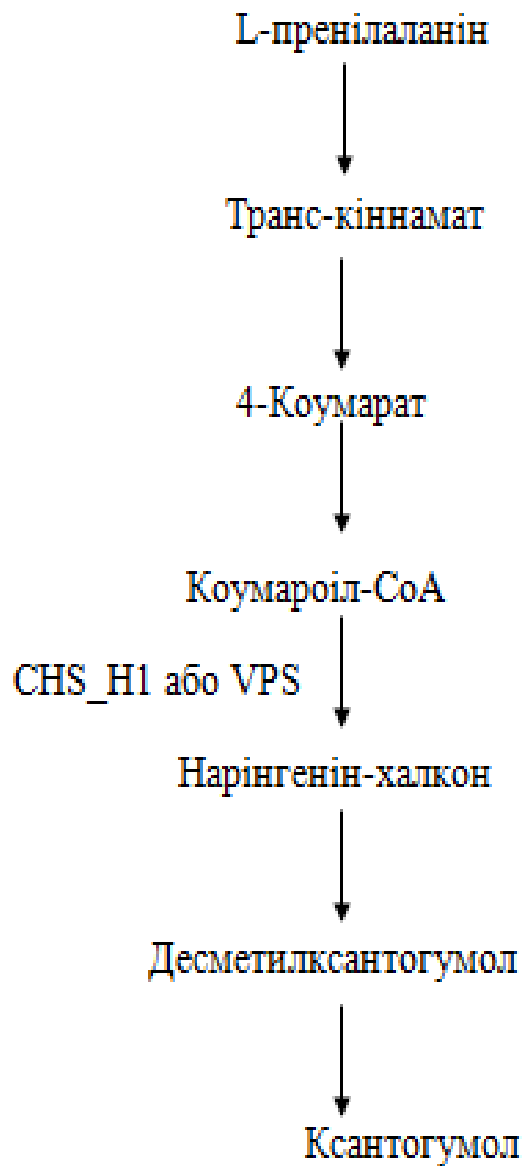


Рис. 1.2. Шлях синтезу ароматичних речовин за участю халконсинтаз [82]

Флорізовалерофенон у подальшому перетворюється на гумулон (гірка α -кислота) та лупулон (гірка β -кислота), нарінгенін-халкон – на ксантогумол, який є прекурсором флавоноїдів [28-30]. У іншому випадку флорізовалерофенон здатний перетворюватись під дією ізопентил-дифосфату на деоксигумулон, який окислюється до гумулону, або під дією ізопентил-дифосфату перетворюється на гірку β -кислоту лупулон [82, 130-131].

Слід зазначити, що каталіз реакції синтезу 6-ізобутил-4гідрокси-2-пірону халконсинтазами виявлено тільки в умовах *in vitro*. Властивості 6-ізобутил-4гідрокси-2-пірону мало досліджені, а його наявність у хмелю не виявлена [88].

Каталітична активність CHS_H1 вища у реакції синтезу нарінгенін-халкону, а каталітична активність VPS вища у реакції синтезу 6-флорізовалерофенону та ізобутил-4гідрокси-2-пірону. CHS2 також здатна каталізувати реакцію синтезу 6-ізобутил-4гідрокси-2-пірону. Каталітична активність CHS2 в реакції синтезу флорізовалерофенону та нарінгенін-халкону не виявлена. CHS4 здатна каталізувати реакцію синтезу 6-ізобутил-4гідрокси-2-пірону, при цьому її активність менша за активність CHS_H1, але вища за CHS2. Каталітична активність CHS4 в реакції синтезу флорізовалерофенону та нарінгенін-халкону не виявлена. Функції CHS3 залишаються невідомими [82, 88].

1.2.2. Похідні халконсинтаз. У літературі довгий час не існувало єдиної класифікації гірких речовин – похідних халконсинтаз. Часто всі β -кислоти називали лупулоном, який отожднювався з β -фракцією, а всі α -кислоти називали гумулоном та отожднювали з α -фракцією. Для запобігання протиріччя розроблено єдину класифікацію [12]:

1. Загальні смоли. До них відносяться тверді смоли, неохарактеризовані м'які смоли, α - та β -кислоти. Це речовини, розчинні у холодному метанолі та диетиловому ефірі.
2. Тверді смоли. Це фракція загальних смол, нерозчинних у парафінових вуглеводнях та з низькою точкою кипіння.
3. Загальні м'які смоли. Це фракція загальних смол, розчинних у парафінових вуглеводнях та з низькою точкою кипіння.
4. β -фракція - суміш β -кислот та α - і β - м'яких смол.

5. α -кислоти. Це гумулон, когумулон, адгумулон, прегумулон і постгумулон.
6. β -кислоти. Це лупулон, колупулон, адлупулон, прелупулон і постлупулон.
7. α - і β -м'які смоли. До них відносяться продукти окислення α - та β -кислот, розчинні у парафінових вуглеводнях та з низькою точкою кипіння.
8. Гулупони. Це гулупон, когулупон, адгулупо- продукти окислення β -кислот, котрі являються маслами.
9. Ізо- α -кислоти. Це ізогумулон, ізокогумулон, ізоадгумулон та їх цис- та трансізомери, котрі утворюються у процесі ізомерізації α -кислот.
10. Гумулінові кислоти. Це продукти окислення α -кислот та їх цис- та трансізомери.
11. Ало- та ізо- α -кислоти. Це ало-ізогумулон, ало-ізокогумулон, ало-ізоадгумулон та їх цис- та трансізомери.

Безпосереднім продуктом відомої каталітичної діяльності CHS_H1 та VPS є нарінгенін-халкон. Нарінгенін-халкон надає напоям специфічний присмак та проявляє антимікробні властивості [114, 116]. Значна частина нарінгенін-халкону перетворюється на десметилксантогумол, який має схожі властивості з нарінгенін-халконом. Десметилксантогумол є попередником ксантогумолу.

Ксантогумол, або 3'-[3,3-диметилаліл]-2',4',4'-тригідрокси-6'-метоксихалкон, та його похідні складають більшу частину пренілфлавоноїдів шишок жіночих рослин хмелю. У хмелю відомо 13 гомологів ксантогумолу [52]. У промисловості використовується також велика кількість штучно утворених гомологів ксантогумолу. Ксантогумол та його похідні мають антимікробні та антионкогенні властивості, надають напоям специфічного смаку, їхні екстракти використовують у парфюмерній, фармакологічній

промисловості та медицині [15, 20, 72, 93]. За рівнем кількості гірких речовин сорти хмелю поділяють на гіркі та ароматичні (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Біохімічні критерії визначення типу сорту хмелю [12]

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

1.2.3. Гени, що кодують халконсинтази. У рослин кодуючі CHS гени представлені родинами, всередині яких постійно спостерігається дивергенція структури та функції [91, 103, 104]. Надродина генів халконсинтаз нараховує 150 гомологів. Найбільш детально вивчені гомологи халконсинтаз – стилбенсинтази, акрідонсинтази, бібензилсинтази, 2-піронсинтази та р-коумароїлтриацетиксинтази [56, 76, 92, 105, 124]. Зокрема, 12 *chs*-послідовностей виявлено у петунії гібридної *Petunia hybrida*. Саузерн-блот аналіз показав наявність щонайменше сіми копій гена *chs* у ячменя *Hordeum leporinum* та шости копій у іпомеї пурпурної *Ipomoea purpurea*. В повністю сиквенованому диплоїдному геномі риса *Oryza sativa* виявлено біля 20 *chs*-генів, що кодують поліпептиди з CHS доменами. Аналіз мультигенної родини *chs* представників родини *Ipomoea* виявив періодичне дублювання та подальшу адаптивну диференціацію дубльованих *chs*-генів. У результаті цієї еволюції спостерігається розвиток специфічності *chs*-генів. Хоча функціональні відмінності між окремими членами мультиродини *chs*-генів залишаються невідомими, структурний аналіз CHS люцерни *Medicago*

truncatula, який здійснений методом кристалографії, може забезпечити молекулярні основи для детального порівняльного аналізу полікетидсинтаз в межах мультиродини *chs*-генів, а також в окремих CHS гомологів [13, 19, 26, 47, 48, 89].

У хмелю звичайного відомо п'ять CHS-генів - *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, що кодують ферменти CHS_H1, CHS2, CHS3, CHS4 та VPS, відповідно [60]. *Chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* сиквеновано, проте повністю анотовано лише *chs_H1* та *vps* [71, 87]. Показано наявність промотору, екзону 1, інтрону, екзону 2 та 3'-нетрансльованого регіону у гена *vps*, екзону 1, інтрону, екзону 2 та 3'-нетрансльованого регіону у гена *chs_H1* та наявність інтрону у генів *chs2*, *chs3* та *chs4*.

Таким чином, відомо, що родина CHS-кодуючих генів є досить великою, халконсинтази широко розповсюджені серед рослин. Разом з цим, не дивлячись на значне дослідження генів даної родини, CHS-кодуючі гени хмелю звичайного досліджені недостатньо [62].

1.3. Біологічна характеристика статі хмелю

Хміль звичайний – багаторічна дводомна рослина, звичайно диплоїдна з $2n = 20$. У хмелю звичайного зустрічаються також однодомні рослини. Виникнення їх пов'язане з утворенням чоловічих суцвіть на жіночих рослинах. Чоловічі суцвіття виростають як з пазух листя головного стебла, так і на гронах у період формування шишок. Чоловічі квітки у більшості випадків не мають пилку, а якщо така квітка утворюється, то, як правило, нежиттєздатна. Найбільш схильні до однодомності гібридні рослини, особливо у перші роки плодоношення [12].

Хміль звичайний в природних умовах розмножується як статевим шляхом, так і вегетативно. При виробничому використанні хміль звичайний розмножують статевим шляхом переважно для створення гібридів.

Існує шість категорій прояву статі хмелю: від рослин, що мають тільки жіночі суцвіття, до рослин, що мають тільки чоловічі суцвіття. Наприклад, можлива наявність стерильних чоловічих суцвіть на жіночих рослинах, що може бути викликано дією ауксину. Рослини з повністю чоловічими або жіночими суцвіттями розглядаються як однодомні зі зміненою упродовж багатьох років експресією [32]. Однодомні рослини хмелю у більшості випадків виникають спонтанно у рослин, отриманих внаслідок схрещування специфічних зразків хмелю і спостерігаються переважно у поліплоїдів, але бувають і у диплоїдів. В ізольованих популяціях однодомні рослини хмелю є переважно чоловічими, хоча зустрічаються популяції з переважно жіночими рослинами або популяції з рівним співвідношенням чоловічих та жіночих однодомних рослин [12].

Хромосома Y - найменша за абсолютним розміром хромосома чоловічого каріотипу хмелю. Вона несе тільки один сигнал в дистальній частині довгого плеча, що є чітким цитогенетичним маркером, що полегшує її виявлення на препаратах [22, 34].

Пошук статеспецифічних ділянок геному хмелю звичайного став досить актуальним завданням у зв'язку з потребою селекційної практики в молекулярних маркерах, пов'язаних зі статтю. Припускається, що чоловіча стать обумовлена X-хромосомою, а Y-хромосома необхідна для повного прояву чоловічого фенотипу та дозрівання пилку [121]. При цьому утворення чоловічої статі у хмелю звичайного може регулюватись X-хромосомою або аутосомами. Через це фенотипово чоловічі та жіночі рослини хмелю можна відрізнити через 1,5-2 роки після проростання, під час цвітіння. Стать хмелю обумовлюється співвідношенням X/A хромосом, як і у деяких інших рослин, зокрема Конопляних (*Cannabis*). При співвідношенні пари X-хромосом до набору аутосом 1:1 рослина має жіночу стать, при співвідношенні 1:0,5 рослина має чоловічу стать. При іншому співвідношенні пари X-хромосом до

набору аутосом рослина буде однодомною з чоловічими та жіночими суцвіттями [34].

На відміну від більшості інших рослин, хромосома Y хмелю коротша за хромосому X. Вираження статі у хмелю може бути не повним. Жіночі рослини хмелю без наявності стерильних чоловічих суцвіть зустрічаються досить рідко [12].

Статеві хромосоми видів роду *Humulus* знаходяться на пізній стадії еволюції статевих систем та являють собою зручні моделі для дослідження цієї стадії [34]. Використання сучасних біотехнологічних засад на слабо досліджених у даному плані геномах рослин роду *Humulus* здатне зробити значний внесок як у теоретичне розуміння феномену статі у рослин, так і для практичного використання у господарстві, зокрема у визначенні статі хмелю на ранніх стадіях онтогенезу.

У пивоварінні використовують тільки жіночі суцвіття - шишки, які повинні залишатися незаплідненими [54, 104, 112-113]. На плантації при вирощуванні хмелю від чоловічих рослин позбавляються. Стать рослин хмелю фенотипово визначається на другий рік росту, тому раннє визначення статі на стадії проростків перед посадкою має важливе значення для селекції та розсадництва, є необхідним для швидкого скринінгу рослин на ранніх стадіях розвитку [7].

1.4. Патогенез бактеріального раку у хмелю

Бактеріальний рак рослин – інфекційне захворювання, збудником якого є бактерія *Agrobacterium tumefaciens* Conn. *A. tumefaciens* відноситься до царства *Procaryotae*, відділу *Gracilicutes*, класу *Scotobacteria*, секції 4 Грамнегативні аеробні палички і коки, родини *Rhizobiaceae*, роду *Agrobacterium*. Пухлини, індуковані *A. tumefaciens*, розвиваються у місці переходу кореня рослини у стебло – шийці, або короні, через що вони

отримали назву “корончаті гали”. Хворі рослини дають менший за кількістю та якістю врожай шишок. Джерелом інфекції є інфікований ґрунт. Також можливе розповсюдження бактеріального раку ураженим *A. tumefaciens* садивним матеріалом [49]. Доведено, що різні сорти хмелю по-різному уражуються бактеріальним раком, що викликано різною товщиною кори та поверхневих тканин.

Утворення корончатого галу починається з проникнення, інтеграції в геном рослинних клітин та експресії специфічного сегменту бактеріальної плазмідної ДНК – так званої Т-ДНК (транспортної ДНК) [49]. Т-ДНК - це частина Ті-плазмиди (від англ. tumor inducing – пухлиноутворююча), що індукує розвиток пухлини; її несуть більшість штамів *A. tumefaciens*. Розмір Т-ДНК коливається від 12 до 24 т.п.н. в залежності від штаму [55]. Штами *A. tumefaciens*, що не мають Ті-плазмиди, не здатні викликати розвиток пухлин. В залежності від фітогормону, синтез якого індукує Ті-плазміда, виділяють опалінові, октопінові та агроцинопінові типи *A. tumefaciens* [40].

«Онкопереродження» клітин рослин, яке призводить до порушення їх поділу та диференціювання, є наслідком зміни ступеня синтезу гормонів, що пов'язано з діяльністю плазмідних генів, інтегрованих в геном рослини у складі Т-ДНК [125]. Слід відзначити, що інтеграція та експресія стосується незначного фрагменту Ті-плазмиди, який називається Т-район, коли він знаходиться в бактерії, та Т-ДНК, коли він присутній в геномі рослин. До цього фрагменту належать гени синтезу опінів (похідних амінокислот, сукцинату, продуктів вуглецево-амінокислотного походження) [49, 51].

Після приєднання *A. tumefaciens*, що несе Ті-плазмиду, до рослинної клітини й активації генів вірулентності (*vir*-генів), Т-ДНК транспортується в клітину, мабуть, за допомогою механізму, аналогічного механізму переносу плазмідної ДНК з донорної клітини у реципієнтну у процесі кон'югації. При цьому Т-ДНК знаходиться у одноланцюговій формі, а саме у такій формі вона вбудовується у хромосомну ДНК рослини [98].

Перехід Т-ДНК в одноланцюгову форму починається з внесення у неї розривів по обом фланкуючим її послідовностям. При цьому права фланкуюча послідовність буде знаходитись на 5`-кінці одноланцюгової Т-ДНК, а ліва – на 3`-кінці. Вважається, що інтеграція Т-ДНК у геном рослини залежить від специфічних послідовностей, локалізованих у правій фланкуючій послідовності, котра має повтор до 25 п.н. [55].

На ділянці *vir* Ті-плазмиди розташовано 20 генів, які необхідні для процесінгу та переносу Т-ДНК. Гени ділянки експресуються оперонами: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virD2*, *virE*, *virG*, *virH*, *virF*, *virK*. Індукція генів *vir* є наслідком взаємовпливу трьох генетичних систем: 1) геному клітини хазяїна, що відповідає за синтез сигнальних молекул, 2) Ті-плазмиди, на якій знаходяться оперони *virA* та *virG*, 3) бактеріальної хромосоми, яка кодує білок ChvE, що розпізнає моноцукри. Оперон *virD2* має консервативну нуклеотидну послідовність [107].

Перенесення Т-ДНК кодується опероном *virB*, який містить 11 генів. Білки оперона формують систему макромолекулярного транспорту – пору або канал (Т-пілі), через який Т-ДНК переноситься до рослинної клітини. Т-пілі є стійкими до впливу факторів навколишнього середовища екстрацелюлярними структурами, що мають 10 нм у діаметрі [98].

Більшість генів Т-ДНК активується тільки після її вбудовування у геном рослини. Їх продукти й викликають утворення корончатого галу. Гени *iaaM* та *iaaH*, відомі також як *tms1* та *tms2* відповідно, кодують ферменти, що приймають участь у синтезі рослинного гормону ауксину. Ген *iaaM* кодує фермент триптофан-2-монооксидазу, котра каталізує трансформацію триптофана у індоліл-3-ацетамід, а ген *iaaH* – фермент індоліл-3-ацетамідгідролазу, яка каталізує утворення індолілоцтової кислоти в індоліл-3-ацетамід [98].

Крім того, Т-ДНК несе ген *tmr* (відомий також як *ipt*), який кодує фермент, що каталізує приєднання до ізопреноїдного бокового ланцюга з

утворюванням цитокінівізопентенілаланіну. При гідроксилюванні цих сполук рослинними ферментами утворюються цитокіни трансзеатин й транскрибозилзеатин, відповідно. І ауксин, і цитокіни регулюють ріст та розвиток рослинної клітини, але, знаходячись у надлишку, можуть викликати у рослин пухлини, такі як корончатий гал [53].

Крім цього, до складу Т-ДНК входять ще два гени (гени 5 та 6b), функції продуктів котрих не відомі. Вважають, що продукт гена 5 перетворює триптофан у індол-3-лактат - фізіологічно неактивний аналог ауксину. Його продукти знаходять на ранніх стадіях регенерації та культури протопластів. Вважають, що його функція пов'язана зі зміною чутливості до гормонів [55].

Отже, пухлиноутворювання, індуковане *A. tumefaciens*, визначено зміною ендогенного гормонального статусу рослини внаслідок експресії в рослинних тканинах агробактеріальних генів, що мають еукаріотичні регуляторні області. Дані пухлиноутворювання здатні змінити господарські якості рослини [115, 129].

Необхідним є розробка та впровадження сучасних біотехнологічних засад, зокрема на основі молекулярних маркерів, для раннього виявлення ураження зразків хмелю звичайного *A. tumefaciens*.

1.5. Біотехнології в генетиці, селекції та розсадництві хмелю

Традиційні способи розмноження хмелю (насінневий та вегетативний) не забезпечують необхідні потреби в сировині фармацевтичної, пивоварної, парфумерної та інших галузей економіки країни. Світовий досвід свідчить, що дана задача отримання здорового садивного матеріалу у необхідній кількості за дуже невеликий проміжок часу вирішується при використанні методу клонального мікророзмноження [43].

Така система виробництва здорового садивного матеріалу має цілий ряд переваг: високий коефіцієнт розмноження (1:500); ведення в лабораторно-тепличних умовах потокового розмноження протягом року; звільнення рослин від вірусних, бактеріальних та грибкових захворювань; одержання з одиниці площі максимальної кількості рослин; довгострокове збереження пробіркових рослин (генофонду).

У цілісному процесі клонального мікророзмноження виділяється декілька основних етапів: добір рослин-донорів, їх вирощування і підготовка до виділення експлантів, стерилізація останніх; клональне мікророзмноження (висадка експлантів на живильні середовища в пробірках, стимуляція розвитку рослин, мікроживцювання пагонів та їх вкорінення); вирощування вийнятих з пробірок рослин-регенерантів в умовах закритого ґрунту; дорощування рослин в умовах відкритого ґрунту до стандартних саджанців. Кожен етап має цілий ряд пов'язаних технологічних процесів. Вирощений здоровий садивний матеріал використовується для створення високопродуктивних сортових маточників в дослідних та базових розсадницьких господарствах.

В Україні роботи з розробки та удосконаленню методів клонального мікророзмноження проводяться в Інституті сільського господарства Полісся НААН України, де знаходиться генетичний банк хмелю. Базова колекція хмелю звичайного нараховує більш 200 зразків, що представляють за походженням досить широкий ареал. Розроблено методи оздоровлення рослин від вірусних хвороб шляхом культури апікальних меристем і термотерапії, а також метод клонального мікророзмноження хмелю, виробнича перевірка якого показала, що за рік можна отримати від однієї рослини хмелю до ста тисяч оздоровлених саджанців [2, 3].

Проведено аналіз морфогенетичних потенціалів різних клітин, тканин та органів хмелю в умовах культури *in vitro* та розроблено технології

клонального мікророзмноження на безвірусній основі науковцями Національного університету біоресурсів та природокористування [4, 5].

Результати досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму різних фракцій геному хмелю та розроблені на їх основі молекулярні маркери успішно впроваджено в селекцію цієї культури для ідентифікації сортів та нового селекційного матеріалу, контролю аутентичності та чистоти сортів, маркерного добору носіїв певних генів агрономічно важливих ознак, визначення соматоклональної варіабельності та генетичної стабільності, генетичного картування, детекції та діагностики патогенів [8, 9]. При цьому використано різні типи молекулярних маркерів, зокрема, RAPD- (Random Amplified Polymorphic DNA – довільно ампліфікована поліморфна ДНК), SSR- (Simple Sequence Repeats – повтори простої послідовності), STS (sequence-tagged sites – послідовність мічених сайтів), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat – послідовності між простими повторами), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів), SNP-маркери (Single Nucleotide Polymorphisms – поліморфізм одиничних нуклеотидів).

До найбільш привабливих для оцінки генетичного різноманіття хмелю науковці віднесли мікросателітні (МС) або SSR-маркери завдяки високому ступеню поліморфізму, кодомінантному характеру успадкування, високої відтворюваності результатів, можливості стандартизації набору маркерів та методик між лабораторіями, можливості автоматизації аналізу [10].

За чотирма МС локусами досліджено варіабельність 124 зразків дикорослого хмелю (з Європи, Азії, Північної Америки) та сортів і селекційних ліній культурного хмелю. Ідентифіковано 63 алеля, в середньому 15,7 алелів на локус. Для зразків з Північної Америки встановлено найбільшу кількість унікальних алелів. Кластерний аналіз згрупував зразки у 10 кластерів за географічним походженням. Аналіз алельного поліморфізму та послідовностей алелів показав, що зародкова

плазма хмелю може бути диференційована на північноамериканський та європейський географічні типи, що демонструє різні еволюційну динаміку та загальні мутації МС послідовностей в межах локусу, що призвели до виникнення двох біогеографічно розділених зародкових плазм [17].

25 мікросателітів ізольовано та охарактеризовано як поліморфні серед 67 зразків хмелю. За допомогою методу ПЛР ампліфіковано 265 алеля, в середньому 10,6 на локус. Автори пропонують потенційне використання добраних маркерів в геномному картуванні та індивідуальній ідентифікації хмелю [110].

Для диференціації та ідентифікації 79 сортів хмелю досліджено 14 МС локусів. Ідентифіковано 73 алеля, в середньому 5,2 на локус. Відмічено, що тетраплоїдні сорти мали набори алелів, ідентичні їх диплоїдним донорам.

Оцінено генетичне різноманіття 68 сортів хмелю зі світової колекції при дослідженні восьми МС локусів. Кількість алелів варіювала від 3 до 25 [96].

За 10 МС локусами оцінено різноманіття 13 сортів хмелю звичайного української селекції [6]. Локус 7a-82 був неполіморфним в межах даної вибірки. Виявлено всього 45 алелів.

Також проведений МС аналіз 14 сортів хмелю звичайного української селекції за 14 локусами [10]. Найбільш поліморфним виявився локус *Н1GT5/Н*. За даними ПЛР-аналізу МС локусів кожний генотип мав індивідуальний набір алелів МС локусів. Запропоновано реєструвати сорти у вигляді генетичної літеро-числової формули: літера означає код локусу, нижній індекс – розмір алелів у п.н. отриманих для даного локусу. Сортова специфічність зареєстрована в базі даних у вигляді генетичних формул, що надають можливість проведення ідентифікації зразків зі спірним походженням, нових генотипів, верифікації садивного матеріалу, а також є необхідними для захисту авторських прав селекціонерів.

Розробка MC маркерів із SSR-збагачених бібліотек вимагає багато часу і є дорогою процедурою [79]. Запропоновано альтернативний підхід пошуку SSR в загальнодоступних базах даних послідовностей, що експресуються (Expressed Sequence Tags, EST). Такі SSR знаходяться в трансльованих генах відомої або передбачуваної (на основі гомології) функції. Вони, як правило, більш консервативні, ніж геномні SSR, тому можуть бути використані в якості якорних маркерів для порівняльного картування та еволюційних досліджень. Оскільки їх отримують із транскриптів, вони корисні для оцінки функціонального розмаїття в природних популяціях або колекціях зародкової плазми. Цей новий тренд в молекулярних маркерах знайшов своє місце і в дослідженнях хмелю.

Так, вісім генних SSR локалізовано в генах, що кодують ключові ферменти біохімічних шляхів продукування вторинних метаболітів, важливих для виробництва пива, та при захисті рослин від патогенів [17]. Це такі SSR: HLC-001A та HLC-001D в гені *fpps* фарнезилпірофосфатсинтази; HLC-005B в гені *vps* валерофенонсинтази; HLC-003A в гені *chs_H1* істиної халконсинтази, HLC-007, HLC-006, HLC-004B в CHS-подібних генах *chs2*, *chs3*, *chs4*; HCH1 в гені ендохітінази класу I. За даними генними SSR оцінено генетичне різноманіття генотипів хмелю звичайного Європи та Північної Америки. Встановлено значно нижчий рівень варіабельності серед європейських сортів, ніж у дикорослих північноамериканських зразків [17].

Відносно нова ДНК-чип-технологія для дослідження різноманіття (Diversity Arrays Technology, DArT) – загальна і економічно ефективна технологія генотипування, яка детектує всі типи ДНК-варіацій (SNP, інделі, метилування), – використано для широкомасштабного генотипування хмелю у спільній роботі науковців Австралії, Великобританії, Словенії, США [58]. Ця робота – перше впровадження DArT у молекулярно-генетичне дослідження хмелю. Ідентифіковано 730 поліморфних маркерів у 92 зразків

хмелю. За цими даними зразки кластеризовано в генетично відмінні північноамериканські та європейські групи з гібридами між цьома двома чітко відокремленими групами. Рівень генетичного різноманіття схожий в північноамериканській та європейській групах, але вище в групі гібридів. Маркери, що продуковано за допомогою цієї технології, будуть цінним джерелом для різноманітних генетичних та селекційних досліджень, таких як картування, тестування генетичної ідентичності тощо.

Молекулярно-генетичні дослідження також спрямовані на аналіз генів агрономічно важливих ознак. Проаналізовано індивідуальні CHS гомологи в різних тканинах і органах хмелю [23, 90, 91]. Проведено скринінг фагмідної кДНК бібліотеки та встановлено нові варіанти послідовностей *chs2* – *chs2*-1308 та *vps* – *vps*-1257. Розроблено і успішно випробувано систему праймерів для специфічної детекції індивідуальних CHS-гомологів та кількісної оцінки їх експресії.

Досліджено поліморфізм розміру інтронних регіонів п'яти генів халконсинтаз [96]. Серед 68 сортів хмелю виявлено поліморфізм в інтронних регіонах генів *chs_H1*, *chs2*. В інтронах генів *chs3*, *chs4* та *vps* не відмічено поліморфізму.

Проаналізовано консервативні екзонні послідовності, що фланкують SSR, генів *vps*, *chs4*, *chs2*, *chs3* у вибірці 46 сортів хмелю [17]. Якщо при дослідженні інтрону 1 *chs4* не генерувалися поліморфні продукти, то шість та 12 продуктів отримано для європейських та північноамериканських генотипів, відповідно, при дослідженні екзону даного гена.

При аналізі гена *chs2* відмічено три та сім продуктів ампліфікації для європейських і північноамериканських сортів, відповідно; при аналізі гена *chs3* – чотири і три фрагменти, відповідно. Ці маркери можуть бути корисними в селекційному процесі при доборі за допомогою маркерів (marker-assisted selection, MAS) за наявності асоціацій між бажаним фенотипом і конкретними SSR-алелями.

Дев'ять SNP виявлено в *vrs*, сім з яких були синонімічними [95]. Два несинонімічних поліморфізми не пов'язані з типовими профілями гірких кислот досліджених 12 сортів [23]. Однак, qRT-PCR-аналіз (real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction, кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу) експресії *vrs* в шишках хмелю показав чіткий зв'язок з вмістом гірких кислот. Найвищі рівні експресії *vrs* спостерігали у двох триплоїдних сортів "Симфонія" і "Ембер", які зазвичай мають високі рівні гірких кислот. У всіх сортів хмелю експресія *vrs* була найнижча у листях і збільшувалася на ранніх стадіях розвитку шишок.

Молекулярно-генетичні дослідження спрямовано не тільки на гени, що кодують ферменти біосинтезу важливих речовин, а також на локуси кількісних ознак (quantitative trait loci, QTL), зокрема, рівень хімічних компонентів шишок [24, 55, 65, 74, 93]. Проте, даних щодо аналізу однієї вибірки хмелю звичайного за всіма відомими QTL рівню хімічних компонентів шишок у літературі не наведено [73].

Щодо молекулярно-генетичних досліджень статевих хромосом, розроблено Y-специфічний STS-маркер для визначення статі: фрагмент ампліфікації розміром 1150 п.н. характерний для зразків чоловічої статі, відсутність даного продукту ампліфікації означає жіночий генотип [98]. Протестовано 1807 рослин хмелю невідомої статі різних схрещувань селекційних зразків колекції Центру досліджень хмелю (Hop Research Center, ФРН) та колекції дикорослого хмелю з використанням шістьох AFLP-маркерів [99]. Наявність / відсутність статеспецифічних фрагментів порівнювали з фенотипом рослини в період цвітіння. Тільки 7 з 1807 рослин показали невідповідність між певним фрагментом та фенотипом (жіночий чи чоловічий). Але при тестуванні світової колекції дикорослого хмелю дані маркери некоректно визначали стать в природній гермоплазмі хмелю Північної Америки, помилка зросла до 50 %. Автори зробили висновок, що

перед інтродукуванням північноамериканської гермплазми в селекційний матеріал необхідно ідентифікувати маркери статі для американського генного пулу хмелю.

Кілька потенційних AFLP-маркерів, зчеплених з чоловічою статтю, отримано в проектах з картування. Асоціацію з чоловічою статтю встановили для двох конвертованих ISSR-маркерів, але їх специфічність відмічено тільки для певних груп сортів [33].

Проаналізовано 174 генотипів культурного та дикорослого хмелю, серед яких 50 чоловічих, 117 жіночих генотипів європейського, північноамериканського та японського походження та сім японських генотипів невизначеної статі, за мікросателітним локусом *PIAGA7* для визначення статеспецифічних відмінностей у хмелю [59]. Встановлено, що певні алелі цього локусу пов'язані з ознакою «чоловіча стать»: алель 165 п.н. характерний для чоловічих генотипів європейського хмелю, алель 210 п.н. – азійсько-північноамериканських генотипів. Автори підкреслюють перевагу даного маркера над іншими, детектування за якими оснований на присутності / відсутності певного фрагмента ампліфікації.

В рамках програми розвитку хмелярства в Новій Зеландії розроблено вісім RAPD-маркерів статі, які конвертовано в більш "зручні" (регіони з охарактеризованою послідовністю (sequenced characterised regions, SCAR) або SNP та підтверджено їх маркуючу здатність в європейських та американських сортах і селекційному матеріалі вищої плоїдності [22].

Серед нових напрямків біологічних наук є біоінформатика. Біоінформатичні дослідження дозволять швидко, з малими фінансовими витратами та точно виявити поліморфні ділянки та провести анотацію генів. Гени, що кодують халконсинтази хмелю звичайного, досліджували біоінформатичними методами, а саме – шляхом вирівнювання нуклеотидних послідовностей та анотації. Так, проведено анотацію генів *chs_H1* та *vps*, а також часткову анотацію генів *chs2*, *chs3* та *chs4*.

Проведено вирівнювання 13 нуклеотидних послідовностей гена *ups* та виявлений поліморфізм в екзонах. Існує досить мало нуклеотидних послідовностей генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного, в NCBI та інших базах даних [87, 96].

Таким чином, незважаючи на значні досягнення в генетичних та молекулярно-генетичних дослідженнях хмелю звичайного та певні успіхи в розробці біотехнологій для вирішення задач селекції та розсадництва хмелю звичайного, залишається відкритим питання залежності рівня гірких речовин від поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, та проблеми виявлення статі хмелю на ранніх етапах онтогенезу і виявлення *A. tumefaciens* в уражених зразках без візуальних симптомів бактеріального раку, чому і присвячено дану дисертаційну роботу.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріал досліджень

Науково-дослідну роботу проводили протягом 2009-2014 років у відділі геноміки і біотехнології Селекційно-генетичного інституту – Національного центра насіннєзнавства і сортовивчення (до квітня 2012 р. – відділ молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру в рослинництві НААН) (м. Одеса, Україна).

2.1.1. Сорти хмелю звичайного. Матеріалом для досліджень слугували сорти (стать – жіноча) хмелю звичайного селекції Інститута сільського господарства Полісся НААН України: Альта, Зміна, Ксанта, Кумир, Надія, Назарій, Оболонський, Поліський, Промінь, Чаклун (гіркі сорти); Видибор, Гайдамацький, Житомирський 75, Заграва, Клон 18, Оскар, Пивовар, Полісянка, Славянка, Хмелеслав (ароматичні сорти), та зразки хмелю звичайного чоловічої статі: 1з 63-2-3, 1к 64-1-1, 2з 63-2-7, 2к 64-2-5, 3з 65-6-1, 4з 68-3-1, 5к 67-3-1, 6к 67-4-8. Дані щодо походження сортів наведено у табл. 2.1 [11].

Таблиця 2.1

Дані щодо походження сортів хмелю звичайного української селекції [9]

Назва сорту	Походження
1	2
Альта	Індивідуальний добір із популяції від схрещування сорту Bullion з чоловічою рослиною невідомого походження

Продовження табл. 2.1

1	2
Видибор	Схрещування сорту Wye Viking з чоловічою рослиною, отриманою від вільного запилення сорту Bullion
Гайдамацький	Схрещування індукованого колхіціном тетраплоїду C_1 сорту Yurog з диплоїдною чоловічою формою складного селекційного походження
Житомирський 75	Гібридизація сорту Клон 18 і рекурентної чоловічої форми невідомого походження
Заграва	Схрещування жіночої рослини з чоловічою I_2 сорту F-108
Зміна	Схрещування материнської форми (добір із гібридної популяції) із чоловічою рослиною I_2 сорту сорту Faggl
Клон 18	Клоновий добір із місцевих сортопопуляцій
Ксанта	Гібрид від другого беккросного покоління та від рекурентної чоловічої форми складного генотипу європейського різновиду і сорту Клон 18
Кумир	Індивідуального добір із F_4 сорту Клон 72 з чоловічою рослиною із Колорадо (США)
Надія	Схрещування материнської форми (добір із гібридної популяції) із чоловічою рослиною сорту Faggl
Назарій	Схрещування материнської форми (добір із гібридної популяції) з чоловічою рослиною I_2 сорту Faggl
Оболонський	Клоновий добір із місцевих сортопопуляцій
Оскар	Схрещування сорту Wye Viking з чоловічою рослиною складного гібридного походження
Пивовар	Гібридизація сорту Клон 18 і рекурентної чоловічої форми складного генотипу
Поліський	Клоновий добір з сорту Northern Brewers (ВБ)

Продовження табл. 2.1

1	2
Полісянка	Гібридизація жіночої рослини В ₂ (Клон 72 / форма із Закарпаття) з чоловічою формою 19-25
Промінь	Індивідуальний добір з гібридної популяції від схрещування жіночої рослини з чоловічою І ₂ сорту F-108
Славянка	Індивідуальний добір із популяції від схрещування ароматичної жіночої рослини із чоловічою І ₂ сорту F-108
Хмелеслав	Гібридизація сорту Bullion з чоловічою рослиною складного гібридного походження
Чаклун	Гібрид від другого беккросного покоління та від рекурентної чоловічої форми складного генотипу європейського різновиду і сорту Клон 18

Біохімічні показники якості шишок сортів хмелю звичайного української селекції наведені у табл. 2.2 [11].

Таблиця 2.2

Біохімічні показники якості шишок сортів хмелю звичайного української селекції [11]

Назва сорту	Масова доля когумулону в складі α -кислот, %	Масова доля колупулону в складі β -кислот, %	Співвідношення кількості β -кислот до α -кислот
1	2	3	4
Альта	20,00-24,00	4,50	0,40
Видибор	24,00-26,00	6,10	1,06
Гайдамацький	26,00-31,00	7,80	1,00-1,30

Продовження табл. 2.2

1	2	3	4
Житомирський 75	24,00-26,00	11,90	1,20
Заграва	26,00-30,00	3,40	1,00-1,30
Зміна	26,00-28,00	5,70	0,50
Клон 18	3,10	26,00-30,00	3,40
Ксанта	30,00-34,00	8,00	0,80
Кумир	19,00-22,00	4,50	0,40
Надія	26,00-29,00	3,00	0,30
Назарій	26,00-28,00	5,00	0,50
Оболонський	24,00-28,00	4,50	0,40-0,50
Оскар	21,00-26,00	6,40	1,06
Пивовар	25,00-29,00	10,60	1,17
Поліський	26,00-30,00	4,50	0,60
Полісянка	23,00-27,00	7,20	1,00-1,20
Промінь	28,00-30,00	5,50	0,50
Славянка	28,00-30,00	7,00	1,50-5,00
Хмелеслав	23,00-26,00	6,50	0,90
Чаклун	34,00-38,00	7,40	0,80

2.1.2. Штам *A. tumefaciens*. Для валідації молекулярних маркерів для оцінки зразків хмелю звичайного на ураженість бактеріальним раком використовували штам *A. tumefaciens* (умовна назва штаму SGI-2009), виділений із зразка хмелю звичайного сорту Альта з візуальними симптомами бактеріального раку (наявність корончатих галів на стовбурі).

2.1.3. Нуклеотидні послідовності. Для біоінформатичних досліджень генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного, використано всі наявні на той час в базі даних GenBank Національного центру біотехнологічної

інформації (National centre of biotechnology information, NCBI) нуклеотидні послідовності гена *chs_H1* AJ304877, AM263199 (повні сиквенси), AM263200, AM263201, FJ554585 (мРНК); гена *chs2* AV061020 (повний сиквенс), AV061021, FJ554586 (мРНК); гена *chs3* AV061022 (повний сиквенс); гена *chs4* AJ430353 (повний сиквенс), FJ554587 (мРНК); гена *vps* (AV015430, AV047593, EU685789, EU685790, EU685791, EU685792, EU685793, EU685794, EU685795, EU685796, EU685797, EU685798, EU685799, EU685800, FJ554588) (повні сиквенси). Для біоінформатичних досліджень Ті-плазмиди використано послідовності Ті-плазмиди октопінового типу - AF242881.1, NG_034313; агроцинопінового типу -U83987, M91189, Z29717, M91188, DQ058764.1, AE007871.2, CP007228; нопалінового типу - AV016260, M11311.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Виділення *A. tumefaciens*. З сорту хмелю Альта з візуальними симптомами захворювання на бактеріальний рак – наявністю корончатих галів на стовбурі, в чисту культуру ізольовано *A. tumefaciens* на живильне середовище YPGA для культивування бактерій біовару 1 (патогенний для рослин) [53]. Для встановлення належності мікроорганізмів до бактерій проведено фарбування за Грамом та первинну мікроскопічну ідентифікацію [50], а надалі для встановлення видової належності застосовували ПЛР-аналіз.

Для накопичення бактеріальної біомаси, достатньої для виділення ДНК, культури *A. tumefaciens* культивували на селективному живильному середовищі у термостаті при + 37° С три доби на чашках Петрі.

2.2.2. Культура апікальних меристем *in vitro*. Для оздоровлення хмелю звичайного від *A. tumefaciens* та культивування експлантів

використовували метод апікальних меристем. Апекси виділяли з апікальної верхівки пагона хмелю звичайного, для чого з підземної частини вегетативного пагона вирізували живці з бруньками відновлення. Живці замочували 1-2 тижні у воді і висаджували у контейнери, заповнені торфом. Посадку проводили так, щоб субстрат повністю покривав весь живець. Пророщували живці при температурі 18-22⁰ С, періодично поливаючи водою так, щоб не пересихав субстрат.

Після того, як пагони досягнули розміру 20-30 см у висоту, з них скальпелем зрізали верхівки розміром 2-3 см. Верхівки промивали в 0,003 % водному розчині Твін 80, потім тканини занурювали на декілька секунд у 70% розчин етилового спирту, промивали стерильною дистильованою водою і переносили у стерилізуючий розчин. Для стерилізації застосовували 3 % водний розчин гіпохлориду натрію. Термін стерилізації складав 5-10 хв.

Якщо тканини були сильно забруднені, здійснювали стерилізацію у 0,2% водному розчині сулеми протягом 2 хв. Після стерилізації тканини ретельно промивали чотири рази стерильною дестильованою водою протягом 30 хв і переносили в стерильні чашки Петрі. Усі операції із стерилізації проводили в боксі у стерильних умовах. При стерилізації використовували стерильні інструменти та посуд.

Після стерилізації з верхівкових бруньок скальпелем знімали покривні листочки і бруньку поміщали в стерильну чашку Петрі та за допомогою голки відкривали апікальну меристему. Потім зрізали апекс з примордіями, приблизно розміром 0,5 мм і за допомогою анатомічної голки висаджували його у банки на живильне середовище Мурасиге-Скуга з додаванням 0,2 мг/л тидіазурону [81]. Банки з апексами поміщали у культуральну кімнату, де їх культивували при температурі 25⁰ С, відносній вологості повітря 70-80 %, освітленні 3 кЛк і фотоперіоді 16 год. Після двох тижнів культивування пробірки з апексом знов переносили в бокс і проводили пересадку апексів на свіжі середовища. Проводили 5 пасажів регенерації.

2.2.3. Виділення тотальної ДНК з рослин. ДНК екстрагували та очищували за протоколом [88]. Фрагмент листя наважкою 50 мг гомогенізували скляним товкачем. Додавали 1,5 мл буферу для екстракції ДНК (100 мМ Трис-НСІ (рН 8,0), 2,0 М NaCl, 20 мМ Na₃EDTA (рН 8,0), 2 % (маса/об'єм, w/v) СТАВ, 1 % (w/v) полівінілпіролідон, 0,5 % (w/v) активоване вугілля). Інкубували лізат при 55⁰ С 30 хв. Центрифугували лізат 10 хв при 16000 об./хв при кімнатній температурі. Переносили верхню фракцію у нову мікропробірку. Додавали один об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом) та перемішували до утворення білої емульсії. Центрифугували лізат 10 хв при 16000 об./хв при кімнатній температурі. Переносили водну фазу у нову мікропробірку. Вносили до водної фази 0,45 об'єму ізопропилового спирту, перемішували шляхом перевертання пробірки. Інкубували протягом 1 год при 25⁰ С. Центрифугували лізат 10 хв при 700 об./хв, зливали супернатант. Вносили у пробірку з осадом 1 мл розчину для промивання (15 мМ ацетат амонію, 75 % етанол). Центрифугували лізат 10 хв при 900 об./хв, зливали верхню фракцію. Підсушували за кімнатної температури 15-20 хв, розчиняли в 50 мкл TE-буферу (10 мМ Трис-НСІ (рН 8,0), 1 мМ Na₃EDTA (рН 8,0)). Додавали РНКазу А до кінцевої концентрації 1 мкг/мл і інкубували 30 хв при 37⁰ С. Виділення ДНК проводили у трьох повторностях.

2.2.4. Виділення ДНК з *A. tumefaciens*. ДНК виділяли за протоколом [53]. Змивали бактеріальну біомасу з поверхні селективного живильного середовища YPGA за допомогою 1 мл лізуючого буферу (50 мМ Трис-НСІ (рН 8,0), 20 мМ Na₃EDTA, 1 % SDS, 500 мМ NaCl) у 1,5 мл мікропробірку. Інкубували лізат 1 год при 65⁰ С, охолоджували до кімнатної температури. Додавали рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), перемішували, центрифугували 4 хв при 16000 об./хв. У нову мікропробірку відбирали надосадову рідину. Додавали 2

об'єма 96 % етилового спирту, перемішували. Розчиняли в 100 мкл ТЕ-буферу. Додавали РНКазу А до кінцевої концентрації 1 мкг/мл і інкубували 1 год при 37 ° С. Додавали 100 мкл 2,5 М ацетата амонію, перемішували. Осаджували ДНК шляхом додавання 800 мкл 96 % етилового спирту. Центрифугували лізат 10 хв при 16000 об./хв. Зливали спирт, підсушували ДНК 15 хв при кімнатній температурі. Розчиняли ДНК в 100 мкл ТЕ-буферу. Виділення ДНК проводили у трьох повторностях.

2.2.5. Оцінка якості та кількості виділеної ДНК. Електрофорез виділеної ДНК проводили шляхом горизонтального “підводного” електрофорезу в 0,8 % агарозному гелі в приладі фірми «Hoefer Scientific Instruments» (США), в 1 х ТВЕ-буфері (89,0 мМ Трис, 89,0 мМ борна кислота, 2,0 мМ Na₃EDTA). ДНК візуалізували забарвленням бромистим етидієм концентрацією 1 мкг/мл. Гелеву пластину фотографували з використанням світлофільтру ОС-12 в ультрафіолетовому світлі (300 нм) за допомогою цифрової фотокамери. Концентрацію виділеної ДНК розраховували відносно ДНК фагу Lambda певної концентрації («Promega», США), за допомогою програми Gel-analyzer (у вільному доступі).

2.2.6. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції. Реакційна суміш для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) об'ємом 20 мкл містила: 1х буфер (0,2 М Трис-НСІ рН 8,4; 0,5 М КСІ; 0,01 % Твін-20); 2,5 мМ MgCl₂; по 0,2 мМ кожного дНТФ; по 0,2 мкМ прямого та зворотного праймерів; 60 нг ДНК; 1 Од ДНК-полімерази Таq. На реакційну суміш нашаровували 20 мкл мінеральної олії. Кожну постановку ПЛР супроводжували негативним контролем (реакційна суміш, що містила воду замість ДНК). Температурно-часові режими такі:

- 1) Для ПЛР-аналізу генів, що кодують халконсинтази, хмелю звичайного (*chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*):

- 120 с при 94⁰ С;
 35 циклів по 30 с при 94⁰ С, 60 с при 54⁰ С та 90 с при 72⁰ С;
 600 с при 72⁰ С.
- 2) Для ПЛР-аналізу статевої Y-хромосоми хмелю звичайного:
 180 с при 94⁰ С;
 35 циклів по 60 с при 94⁰ С, 60 с при 65⁰ С та 120 с при 72⁰ С;
 420 с при 72⁰ С.
- 3) Для ПЛР-аналізу мікросателітного локусу H1AGA7 хмелю звичайного:
 300 с при 95⁰ С;
 28 циклів по 45 с при 94⁰ С, 30 с при 54⁰ С та 90 с при 72⁰ С;
 480 с при 72⁰ С.
- 4) Для ПЛР-аналізу патогенної Tі-плазміді *A. tumefaciens*:
 120 с при 96⁰С;
 30 циклів по 60 с при 94⁰ С, 180 с при 55⁰ С та 60 с при 72⁰ С;
 120 с при 72⁰ С.

Інформацію про послідовності праймерів для дослідження статевих хромосом хмелю звичайного наведено в табл. 2.3 [59, 99].

Таблиця 2.3

Інформація щодо праймерів для ПЛР-дослідження статевих хромосом хмелю звичайного [59, 99]

Локус	Назва та послідовність (5'-3') праймера	
	прямого	зворотнього
1	2	3
Y-хромосома	STSF acagagtacaactcagaacaacc	STSR aaggtcgacaatgaccg

Продовження табл. 2.3

1	2	3
Мікросателітний локус HIAGA7	HIAGA7F acaagcagtaatgatgagga	HIAGA7R tccaagtctctcaattagaa

Інформацію про послідовності праймерів для дослідження Ті-плазмід наведено в табл. 2.4 [53].

Таблиця 2.4

Праймери для ПЛР-аналізу Ті-плазмід [53]

ен	Назва та послідовність (5'-3') праймера	
	прямого	зворотнього
<i>vir</i> D2	VirA atgcccgatcgagctcaagt	VirC cctgacccaaacatctcggtgcccc
<i>ipt</i>	Cyt F gatcgggtccaatgctgt	Cyt R gatatccatcgatcttt

Інформацію про послідовності праймерів для дослідження генів, що кодують халконсинтази, хмелю звичайного наведено в табл. 2. 5 [17, 23, 69, 94].

Таблиця 2.5

Праймери для ПЛР-аналізу генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного [17, 23, 70, 96]

Ген, регіон	Назва та послідовність (5'-3') праймера	
	прямого	зворотнього
1	2	3

Продовження табл. 2.5

1	2	3
<i>chs_H1</i> , 3'нетрансльований регіон	CHS_H1F1 tcaagaccactggagaaggac	CHS_H1R1 tacagtgagctacaagaccatt
<i>chs_H1</i> , інтрон	CHS_H1F2 cagagtgagtaccggattactac	CHS_H1R2 cctcagttaagtgcattgtaacg
<i>chs_H1</i> , інтрон	CHSJ6 gagcacaactgagctcaagg	CHSJ5 gcatgtaacgctttctaatacatgg
<i>chs_H1</i> , екзон 2	CHSJ4 gtctcaacagtgagtccagg	CHSJ3 atgatgtaccaacaagggtg
<i>chs2</i> , інтрон	CHS23F caagctgattatcctgactactac	CHS2R cttcggtgaaatacatatgacg
<i>chs3</i> , інтрон	CHS23F caagctgattatcctgactactac	CHS3R cttcgctcaagaccaggtgacg
<i>chs4</i> , інтрон	CHS4F caagctgatttctgactactat	CHS4R cttcggtcaagtacaggtgacg
<i>vps</i> , інтрон	VPSF caagctgatttcccgactactac	VPSR cttcggtcaagtgcaagtaacg
<i>vps</i> , екзон 1, інтрон, екзон 2	Vps-Start ggcgtccgtaactgtagagc	Vps-End ttagacgtttgtgggcacgc
<i>vps</i> , екзон 2	5'Vps- S2 gttgaagttcccaagcttgg	3'Vps-S2 aatcccaatcggagtggaagg
<i>vps</i> , 5' нетрансльований регіон	HLC-005BF acaccttacctaaccatgcac	HLC-005BR ccttcggatttgccttacagt

2.2.7. Гель-електрофорезний розподіл продуктів ампліфікації.

Розподіл продуктів ампліфікації, отриманих при ПЛР-аналізі Ті-плазмиди та з парою праймерів STS, проводили шляхом горизонтального “підводного” електрофорезу в 2 % агарозному гелі в приладі фірми «Hoefler Scientific Instruments» (США), в 1 x TBE-буфері. Продукти ПЛР, отримані з парами праймерів до генів, що кодують халконсинтази, та парою праймерів до локусу H1AGA7, розділяли у 10 % поліакриламідному (ПАА) гелі в 1x TBE-буфері при постійній напрузі 500 В і температурі 60 °С 2-4 год залежно від розмірів фрагментів ампліфікації, в апараті для вертикального гель-електрофорезу («Хелікон», РФ). Перед нанесенням продуктів ампліфікації в гель проводили префорез протягом 30 хв при постійній напрузі 300 В і температурі 60 °С.

2.2.8. Візуалізація продуктів ПЛР. Продукти ПЛР, розділені в агарозі, візуалізували забарвленням бромистим етидієм. Агарозну пластину поміщали у 1x TBE буфер з бромистим етидієм концентрацією 1 мкг/мл на 15 хв. Пластину промивали деіонізованою водою та фотографували з використанням світлофільтру ОС-12 в ультрафіолетовому світлі (300 нм) за допомогою цифрової фотокамери.

Візуалізацію продуктів ПЛР, розділених в ПААГ, проводили нітратом срібла. Пластину ПАА промивали деіонізованою водою 1 хв і проводили фіксацію ДНК 10,0 % етанолом протягом 10 хв. Переносили пластину в 1,0 % азотну кислоту на 6 хв і промивали 3 рази деіонізованою водою при безперервному струшуванні.

Пластину поміщали на 30 хв в 0,012 М AgNO₃ в темряві, періодично струшуючи. Пластину промивали двічі деіонізованою водою при інтенсивному струшуванні. Інкубували пластину у поновлюючому розчині (0,28 М Na₂CO₃, 0,019 % формалін), замінюючи розчин після кожного потемніння, до появи фарбування фрагментів ампліфікації. Фіксували

пластину у 10,0 % оцтової кислоти 5 хв. Гель промивали 2 хв деіонізованою водою і зберігали між двома листами прозорої поліетиленової плівки.

2.2.9. Визначення розмірів продуктів ампліфікації. Розміри продуктів ампліфікації розраховували за допомогою системи документації і аналізу гелів «Image Master VDS» («AmershamPharmacia Biotech», СКВ) згідно з інструкцією для користувача. Результати аналізу представляли в системі 1/0: присутність/відсутність продукту ампліфікації з визначеною молекулярною масою, відповідно.

2.2.10. Біоінформатичні методи. Проводили вирівнювання 26 нуклеотидних послідовностей генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного, за алгоритмом Clustal W за допомогою програми TREES 4.0 та Vector-NTI 11. Дані програми знаходяться у вільному доступі.

Проводили локальне вирівнювання 26 нуклеотидних послідовностей генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного (*chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*), проти всіх нуклеотидних послідовностей бази даних Genbank NCBI за алгоритмом Сміта-Вотермана за допомогою онлайн-програми BLAST та підпрограмою blastn (у вільному доступі) [108].

Проводили локальне вирівнювання послідовностей праймерів до генів *ipt* та *virD2* проти всіх нуклеотидних послідовностей бази даних Genbank NCBI за алгоритмом Сміта-Вотермана за допомогою онлайн-програми BLAST та підпрограмою blastn (у вільному доступі).

Достовірність результатів вирівнювання нуклеотидних послідовностей обраховували за допомогою бут-стреп аналізу. Достовірним вважали результат, більший за 70.

Сайти праймування для використаних в роботі праймерів до генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного та генів вірулентності і

патогенності Ті-плазмід, визначали за допомогою програми Vector-NTI 11. Анотацію генів *chs2*, *chs3* та *chs4* проводили за допомогою програми UGENE (у вільному доступі).

2.2.11. Математичні методи. Генетичні дистанції розраховували й проводили кластерний аналіз за допомогою програми TREES 4.0. Побудову дендрограми здійснювали за парногруповим методом кластеризації з арифметичним усередненням (Unweighted Pair-Group Method, UPGMA) та за методом кластеризації за найбільшою подобою (Maximum composite likelihood method, MCLM) [117].

Достовірність перевіряли за допомогою коефіцієнту рангової кореляції Спірмана для малих вибірок [109]:

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

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 щодо дорівнювання нулю коефіцієнта рангової кореляції Спірмана $H_0: r = 0$ при конкуруючій гіпотезі $H_1: r \neq 0$, обраховували критичну точку:

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

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

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

Довірчий інтервал обраховували за формулою:

$$r = p - t((1 - p^2) / \sqrt{n}); p + t((1 - p^2) / \sqrt{n}).$$

2.2.12. Загальна схема роботи. Для проведення досліджень розробили загальну схему роботи (рис. 2.1). Роботу проводили у три етапи. На першому етапі здійснювали біоінформатичне та молекулярно-генетичне дослідження генів вірулентності та патогенності Ті-плазмід. За аналізом результатів оцінювали можливість детекції збудника бактеріального раку рослин у хмелю звичайного за молекулярними маркерами. На другому етапі на основі результатів першого етапу проводили оцінку, добір та введення в культуру *in vitro* методом апікальних меристем зразків хмелю звичайного вільних від *A. tumefaciens*. Третій етап містив молекулярно-генетичне та біоінформатичне дослідження генів, що кодують халконсинтази; молекулярно-генетичне дослідження поліморфізму мікросателітного локусу H1AGA7 та Y-хромосоми на вибірці зразків хмелю звичайного української селекції та нуклеотидних послідовностей з бази даних GenBank NCBI. За результатами дослідження оцінювали залежність між поліморфізмом генів, що кодують халконсинтази, та типом сорту хмелю звичайного і можливістю використання поліморфізму мікросателітного локусу H1AGA7 та певних ділянок Y-хромосоми для визначення статі хмелю звичайного.

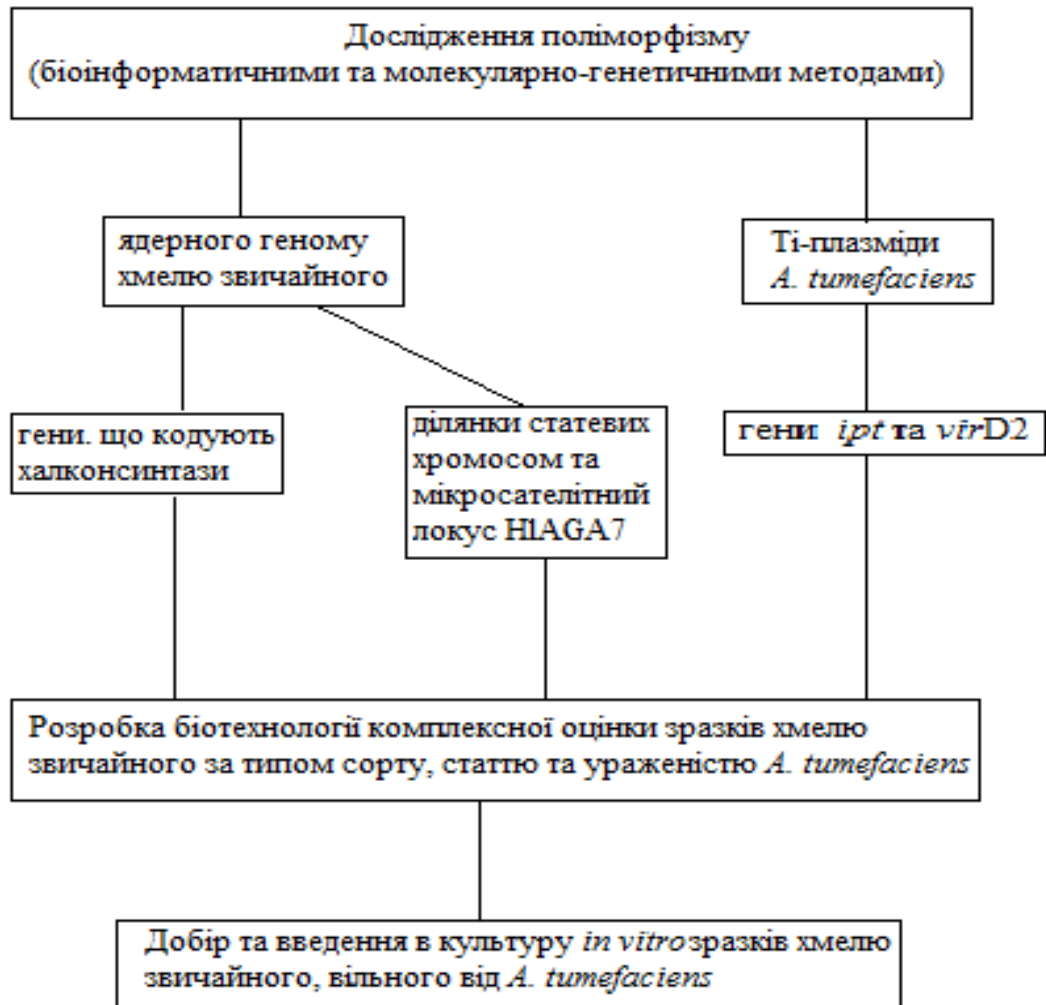


Рис. 2.1. Загальна схема проведення дослідження

РОЗДІЛ 3

ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ, ДОБІР ТА ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN* *VITRO* ЗРАЗКІВ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО, ВІЛЬНИХ ВІД *A. TUMEFACIENS*

Бактеріальний рак – захворювання, що призводить до порушення якостей рослини, пухлиноутворення та подальшої загибелі. У господарстві припустимим є використання лише здорових зразків хмелю звичайного. На теперішній час не існує ефективних методів оздоровлення, тому рослина, у якої виявлений бактеріальний рак, підлягає знищенню.

На ранніх стадіях захворювання візуально неможливо виявити ураження [129]. Для виявлення захворювання широко використовується мікробіологічний метод, який є довготривалим та незручним [53]. До того ж мікробіологічний метод дозволяє виявити збудника бактеріального раку рослин – *A. tumefaciens*, але не дозволяє виявити у нього онкоутворюючу Ті-плазмиду. Тому даний етап досліджень присвячено розробці більш ефективної біотехнології для виявлення ураження хмелю звичайного *A. tumefaciens* та добору здорового садивного матеріалу.

3.1. Біоінформатичне дослідження генів *ipt* та *virD2* Ті-плазмиди

Більшість праймерів, сконструйованих для видо- і родоспецифічної детекції патогенів, засновано на варіабельності послідовностей ДНК в регіонах внутрішніх транскрибованих спейсерів ядерної рибосомної ДНК. Кластери рибосомних генів завдяки особливостям їх структурно-функціональної організації, вважаються найбільш перспективними для діагностичного використання. Регіони багатокопійної рДНК, які включають

внутрішні транскрибовані спейсери (ITS1 і ITS2) 5,8S рДНК, є придатними для ампліфікації в ПЛР і містять ділянки, які значно різняться за швидкістю молекулярної еволюції.

Для видової ПЛР-детекції *A. tumefaciens* використовували пари праймерів: Cyt F та Cyt R, які фланкують консервативну послідовність гена Ті-плазмиди *ipt*, що містить внутрішні транскрибовані спейсери, розмір продукту ампліфікації - 427 п.н.; - Vir A і Vir C, які фланкують найбільш консервативний регіон гена Ті-плазмиди *vir D2*, розмір продуктів ампліфікації – 224 п.н. [53].

Ефективність даних праймерів показана на октопінових та нопалінових типах *A. tumefaciens*. Даних щодо ідентифікації агроцінопінових типів *A. tumefaciens* у літературі не наведено, що робило використання даних праймерів при виявленні бактеріального раку у рослин неефективним, адже не виключалась можливість ураження рослини саме агроцінопіновим типом *A. tumefaciens* [41].

Окрім цього, при використанні даних праймерів не виключалась можливість отримання продуктів ампліфікації з іншою ДНК, зокрема Rі-плазмідною. Дана плазміда також є притаманною для *A. tumefaciens* та викликає інше пухлинне захворювання рослин – т. з. «бородатий корінь», симптоми якого є схожими з бактеріальним раком [98].

За допомогою онлайн-програми BLAST, а саме blastn проведено вирівнювання послідовностей праймерів Cyt F та Cyt R, які фланкують консервативну послідовність гена Ті-плазмиди *ipt*, та Vir A і Vir C, які фланкують найбільш консервативний регіон гена Ті-плазмиди *virD2* відносно нуклеотидних послідовностей усієї бази даних GenBank NCBI. За результатом отримано нуклеотидні послідовності, ділянки яких - повністю або частково - комплементарні послідовностям пар праймерів Cyt F та Cyt R і Vir A та Vir C.

Серед таких нуклеотидних послідовностей, ділянки яких були повністю комплементарні даним парам праймерів, були Ті-плазмідні октопінового, нопалінового, агроцінопінового та невстановленого типів. Послідовностей інших плазмід, органел, вірусів або організмів не виявлено.

Таким чином, показано ефективність та селективність використання молекулярних маркерів *ipt* та *virD2* для ідентифікації *A. tumefaciens* нопалінового, октопінового та агроцінопінового типів. Проте залишались невідомими розміри ділянок, які фланкують пари праймерів праймерів Cyt F та Cyt R і Vir A та Vir C у Ті-плазміді агроцінопінового типу.

Пошук сайтів праймування використаних праймерів на виявлених нуклеотидних послідовностях Ті-плазміді нопалінового, октопінового та агроцінопінового типів проводили за допомогою програми Vector-NTI. Результати досліджень наведені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Розмір ділянок нуклеотидних послідовностей Ті-плазмід, що фланкуються парами праймерів Cyt F та Cyt R і Vir A та Vir C

Нуклеотидна послідовність	Тип плазмід	Розмір ділянки (п.н.), що фланкується парами праймерів	
		Cyt F та Cyt R	Vir A та Vir C
1	2	3	4
AF242881.1	октопіновий	427	338
NG_034313	октопіновий	427	224
AB016260	нопаліновий	427	338
M11311	нопаліновий	427	338

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4
U83987	агроцинопіновий	427	224
M91189	агроцинопіновий	427	224
Z29717	агроцинопіновий	427	224
M91188	агроцинопіновий	427	224
DQ058764.1	агроцинопіновий	427	338
AE007871.2	агроцинопіновий	427	338
CP007228	агроцинопіновий	427	661

За результатом біоінформатичних досліджень, ділянка гена *ipt*, що фланкується парою праймерів Cyt F та Cyt R, є консервативною та має розмір 427 п.н. Ділянка гена *virD2*, що фланкується парою праймерів Vir A та Vir C, виявилась поліморфною. Нуклеотидна послідовність плазмід кожного типу містила описані в літературі регіони розмірами 224 та 338 п.н. [53]. Нуклеотидна послідовність агроцинопінової Tі-плазмід CP007228 містила регіон розміром 661 п.н.

Таким чином, проведений біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей Tі-плазмід різних типів та показано видоспецифічність пар праймерів Cyt F та Cyt R і Vir A та Vir C для детекції збудників бактеріального раку рослин. Встановлена можливість використання маркерів *ipt* та *virD2* для ідентифікації *A. tumefaciens* нопалінового, октопінового та агроцинопінового типів. Показана консервативність ділянки гену *ipt*, що фланкується парою праймерів Cyt F та Cyt R та має розмір 427 п.н. Дані результати збігаються з літературними даними.

При біоінформатичному аналізі регіону гена *virD2* Tі-плазмід, що фланкується парою праймерів Vir A та Vir C, виявлено як описаний фрагмент розміром 224 п.н., так і раніше неописані фрагменти розмірами 338 та 661 п.н.

3.2. Молекулярно-генетичне дослідження генів *ipt* та *virD2* Ті-плазмід

Отримано розчин ДНК *A. tumefaciens* у препаративній кількості для подальшого використання в якості позитивного контролю при ПЛР-детекції збудника бактеріального раку у рослинному матеріалі. Культура *A. tumefaciens* попередньо ізольована із зразка хмелю звичайного сорту Альта, який мав ознаки бактеріального раку (наявність корончатих галів на стовбурі) та культивована на селективному живильному середовищі для *A. tumefaciens*.

Виділення тотальної ДНК хмелю звичайного здійснювали за методом з використанням вугілля [88], який дозволив отримати препарати ДНК без домішок.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз ДНК *A. tumefaciens*, ізольованих зі стовбуру хмелю звичайного сорту Альта з зовнішніми ознаками бактеріального раку (наявність корончатих галів) (рис. 3.1).

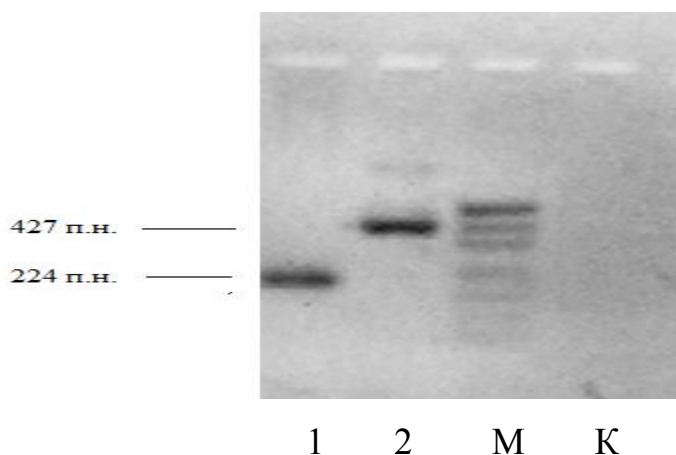


Рис. 3.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації генів *ipt* та *virD2* Ті-плазмід в зразках ДНК *A. tumefaciens*. М – маркер молекулярної маси рUC19 DNA/MspI. К – негативний контроль (ПЛР-суміш без ДНК)

Наявність продуктів ампліфікації як гену *ipt*, так і гену *virD2* дозволяє використовувати в подальшому ДНК штаму SGI-200 в якості позитивного контролю.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз генів *ipt* та *virD2* Ті-плазмід на зразках тотальної ДНК, виділеної з тканин сортів хмелю звичайного української селекції. Виділено сумарну ДНК (рослинну та бактеріальну) з стеблю хмелю сорту Альта з візуальними симптомами ураження бактеріальним раком (наявність на стовбурі корончатих галів) як модельний зразок, а також сумарну ДНК з тканин донорних рослин сортів хмелю звичайного української селекції, призначених для введення в культуру *in vitro* (10 зразків кожного сорту) за методом [88]. Даний метод виділення ДНК враховує наявність в тканинах хмелю звичайного високого рівня пігментів, α - і β -кислот, ароматичних сполук та їх похідних, а також і інших речовин.

За результатом аналізу усі зразки сортів Зміна, Ксанта, Кумир, Надія, Назарій, Оболонський, Поліський, Чаклун, Видибор, Гайдамацький, Житомирський 75, Заграва, Клон 18 (рис. 3.2), Оскар, Пивовар, Полісянка, Славянка, Хмелеслав ідентифіковано як здорові.

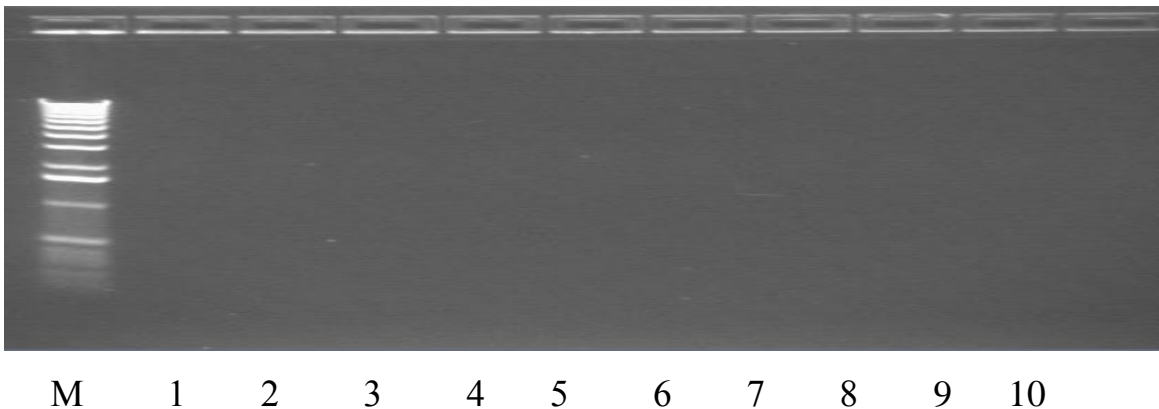


Рис. 3.2. Результати ПЛР-аналізу регіонів генів Ті-плазмід *ipt* (1-5) та *virD2* (6-10) в тотальній ДНК, виділеної з тканин зразків сорту хмелю звичайного Клон 18. М – маркер молекулярної маси ДНК pUC19/MspI

Для встановлення рівня чутливості детекції на основі ПЛР-аналізу та уникнення псевдонегативних результатів аналізували суміші ДНК *A. tumefaciens* (штам SGI-2009) та ДНК зразків хмелю, в яких не виявлено агробактеріальну ДНК (на прикладі зразків сортів Альта і Клон 18) у співвідношенні 1 : 1, 1 : 5 та 1 : 10 (рис. 3.3).

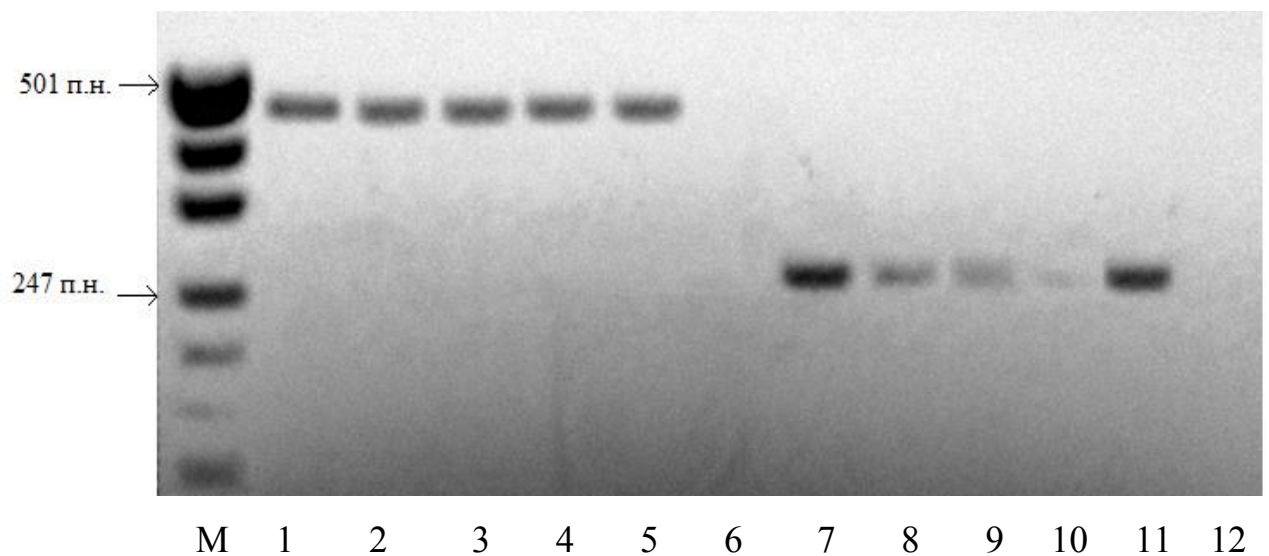


Рис. 3.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації регіонів генів *ipt* (1-6) та *virD2* (7-12) в ДНК *A. tumefaciens* (штам SGI-2009) (1, 7), суміші ДНК *A. tumefaciens* та хмелю сорту Клон 18 в співвідношенні 1:1, 1:5, 1:10 (2-4, 8-10), ДНК хворого на бактеріальний рак зразка сорту Альта (5, 11) та зразка сорту Клон 18 (6, 12), відповідно. М – маркер молекулярної маси ДНК pUC19/MspI

Продукти ампліфікації очікуваних розмірів отримано для регіонів генів Ті-плазмиди *ipt* (1-6) та *virD2* (7-12) в ДНК *A. tumefaciens*, суміші ДНК *A. tumefaciens* та всіх зразків хмелю сорту Клон 18 в співвідношеннях 1:1, 1:5, 1:10 і хворого на бактеріальний рак зразка сорту Альта. Отримані результати демонструють можливість на фоні ДНК хмелю детектувати Ті-плазмиду *A. tumefaciens* на різних етапах ураження та виключити псевдонегативні результати.

Слід зазначити, що використаний метод виділення тотальної ДНК з тканин хмелю звичайного є придатним для визначення наявності патогенної Ті-плазмиди октопінового, нопалінового та агроцинопінового типів. Дана методика дозволяє уникнути ізоляції мікробіоти тканин хмелю звичайного, що зменшує витрати часу на ідентифікацію бактеріального раку, що є особливо актуальним при роботі з великою кількістю зразків.

3.3. Культивування хмелю звичайного *in vitro*

Результати ПЛР-тестування донорних рослин хмелю щодо наявності ураження *A. tumefaciens* дозволили добрати зразки, вільні від *A. tumefaciens*, для подальшого культивування. Зразки введено в культуру *in vitro* на середовище Мурасиге-Скуга з додаванням 0,2 мг/л тидіазурону методом апікальних меристем [81]. Проведено п'ять пасажів. Біометричні показники розвитку експлантів хмелю звичайного наведено в табл. 3.2. Отримані експланти рекомендовано для введення в культуру *in vivo* або для подальших біотехнологічних та молекулярно-генетичних досліджень.

Таблиця 3.2

Біометричні показники розвитку експлантів хмелю звичайного

Сорт хмелю звичайного	Висота надземної частини регенерантів, см	Довжина кореневої системи регенерантів, см
1	2	3
Альта	7,20 ± 0,70	0,40 ± 0,08
Видибор	4,70 ± 0,30	0,35 ± 0,04
Гайдамацький	5,25 ± 0,45	0,50 ± 0,07

Продовження табл. 3.2.

1	2	3
Житомирський 75	5,10 ± 0,50	0,45 ± 0,03
Заграва	5,50 ± 0,60	0,30 ± 0,04
Зміна	4,70 ± 0,90	0,40 ± 0,06
Клон 18	5,00 ± 0,70	0,80 ± 0,20
Ксанта	4,50 ± 0,50	0,70 ± 0,12
Кумир	3,80 ± 0,40	0,60 ± 0,05
Надія	5,10 ± 0,30	0,40 ± 0,08
Назарій	4,90 ± 0,60	0,55 ± 0,30
Оболонський	4,70 ± 0,50	0,40 ± 0,05
Оскар	4,80 ± 0,30	0,35 ± 0,04
Пивовар	5,10 ± 0,45	0,70 ± 0,12
Поліський	4,60 ± 0,35	0,60 ± 0,09
Полісянка	4,90 ± 0,25	0,40 ± 0,05
Промінь	5,20 ± 0,30	0,45 ± 0,04
Славянка	4,90 ± 0,40	0,50 ± 0,08
Хмелеслав	4,60 ± 0,30	0,35 ± 0,06
Чаклун	5,40 ± 0,45	0,40 ± 0,07

Отже, за даними ПЛР-аналізу добрано та введено в культуру *in vitro* 197 зразків 20 сортів хмелю звичайного української селекції; отримані експланти хмелю звичайного є здоровими. Рекомендовано їх подальше використання для досліджень та для введення в культуру *in vivo*.

Таким чином, оптимізовано систему детекції *A. tumefaciens*, що викликає бактеріальний рак рослин, зокрема хмелю звичайного, за допомогою молекулярних маркерів генів *virD2* та *ipt*. Дана система дозволяє

виявити пухиноутворюючу Ті-плазмиду октопінового, нопалінового та агроцинопінового типів. До переваг розробленого підходу відноситься уникнення стадії ізоляції мікробіоти тканин хмелю звичайного, що зменшує витрати часу на ідентифікацію бактеріального раку, що є особливо актуальним при роботі з великою кількістю зразків.

Двоетапна перевірка наявності у тотальній ДНК Ті-плазмиди важлива для оцінювання ризику наявності *A. tumefaciens* у тканині хмелю. Так, при наявності у Ті-плазмиді онкогена *ipt*, але при відсутності регіону *virD2*, який відповідає за вірулентність, *A. tumefaciens* не здатна викликати бактеріальний рак рослин, тому за відсутності регіону *virD2* наявність *A. tumefaciens* є припустимою.

Результати розділу опубліковано у роботах:

1) Венгер А.М. Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Мікробіологія і біотехнологія . – 2014. – № 1. – С. 60-66.

2) Венгер А.М. Молекулярні маркери для детекції бактеріального раку хмеля звичайного (*Humulus lupulus* L.) /А.М. Венгер, Н.Е.Кожухова, Ю.М. Сиволап // Тези VI Міжнародної конференції «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека» (Геном рослин VI). – Одеса, 07-10.09.2010 р. – С. 15.

3) Венгер А.М. Оцінка генотипу хмелю звичайного за генами, що кодують халконсинтази, статтю та ураженістю бактеріальним раком / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур». – 2014. – С. 72.

4) Спосіб детекції збудника бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens* у хмеля звичайного / Кожухова Н.Е., Венгер А.М., Сиволап Ю. М. // Патент на корисну модель. – 2011. – Бюл. № 24. – 6 с.

5) Кожухова Н.Е. Сучасні молекулярно-генетичні дослідження хмелю (огляд) / Н.Е. Кожухова, А.М. Венгер, Ю.М. Сиволап, Б.Ф. Кормільцев // Збірник «Агропромислове виробництво Полісся». - 2011. – Вип. 4. – С. 62-67.

6) Венгер А. Вивчення дії тидіазурону на ріст *in vitro* хмелю звичайного / А. Венгер, Н. Кожухова // Збірник тез VII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології». - Львів, 05-08.04.2011 р. - С. 346.

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ХАЛКОНСИНТАЗИ

У хмелю звичайного сиквеновано всі гени, що кодують халконсинтази. З них повністю анотовано гени *chs_H1* та *vps* [71, 87]. Ген *chs_H1* складається з промотору, екзону 1, інтрону, екзону 2 та 3'-нетрансльованого регіону (3'-НТР); ген *vps* складається з промотору, екзону 1, інтрону та екзону 2. У промоторів *vps* та *chs_H1* виявлено регіони, подібні до Н-боксу, та ядро G-боксу. У генів *chs2*, *chs3* та *chs4* відома наявність інтрону [96].

Наше дослідження складалось з декількох етапів: вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів, що кодують халконсинтази, відносно одна одної та всіх наявних нуклеотидних послідовностей в базі даних GenBank NCBI; виявлення поліморфних ділянок; анотація генів *chs2*, *chs3* та *chs4*; молекулярно-генетичний аналіз генів, що кодують халконсинтази, у сортів хмелю звичайного української селекції.

4.1. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів, що кодують халконсинтази

Проведено вирівнювання всіх наявних у базі даних GenBank NCBI нуклеотидних послідовностей генів, що кодують халконсинтази, хмелю звичайного, а саме п'яти нуклеотидних послідовностей гена *chs_H1*, трьох – гена *chs2*, однієї – гена *chs3*, двох – гена *chs4*, 15-ти – гена *vps* відносно одна одної та всіх нуклеотидних послідовностей бази даних GenBank NCBI. Результати кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* відносно всіх наявних у базі даних NCBI нуклеотидних послідовностей генів наведені на рис. 4.1.

достовірному рівні бут-стреп аналізу гени *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* хмелю звичайного знаходяться у одному кластері, а ген *chs_H1* – в іншому, утворюючи з геном *chs* іншого представника родини *Cannabaceae* коноплі посівної *Cannabis sativa* окрему групу В в кластері І.

Ген *bac*, що кодує бензилацетонсинтазу, ревіню пальчатого *Rheum palmatum* на дендрограмі розташований окремою гілкою в кластері І. До групи А кластеру І увійшли гени представників родини Розові *Rosaceae* – *chs* груші звичайної *Pyrus communis*, груші японської *P. pyrifolia*, яблуні домашньої *Malus domestica*, яблуні торинговидної *M. toringoides*, вишні пташиної *Prunus persica* та ген *chs3* персикового дерева *P. avium*. Гени *chs6* та *chs7* тополі бальзамічної *Populus trichocarpa* увійшли до однієї гілки кластеру І. До групи С кластеру І увійшли гени представників родини Мальвові *Malvaceae* – *chs2*, *chs5* та *chs7* бавовнику шорсткого *Gossypium hirsutum* та *chs* бамії *Abelmoschus esculentus*. До групи D кластеру І увійшли гени представників порядку Вересоцвіті *Ericales* – *chs* чорниці високорослої *Vaccinium corymbosum*, актинідії китайської *Actinidia chinensis*, рододендрону Сімса *Rhododendron simsii*, та *chs2* камелії грійсійської *Camellia grijsii*, а також *chs* предствника порядку Кизилоцвітні *Cornales* гортензії крупнолистокової *Hydrangea macrophylla*. Гени *chs10* та *chs1* троходендрону аралієвидного *Trochodendron aralioides* увійшли до однієї гілки кластеру І. До групи Е кластеру І увійшли гени представників родини Бобові *Fabaceae* – *chs* сени торової *Senna tora* та генами *chs2* та *chs3* *Glycyrrhiza uralensis*. До групи F кластеру І увійшли гени представників роду іпомеї *Ipomoea* – *chs-D* іпомеї пурпурної *I. purpurea* та *chs-DIII* іпомеї бататної *I. batatas*.

Результати вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* наведено в додатку. За результатами вирівнювання ген *chs_H1* є поліморфним як за розміром, так і за послідовністю через наявність SNP; ген *chs2* є поліморфним через наявність SNP; ген *chs4* є поліморфним

як за розміром, так і через наявність SNP; ген *vps* є поліморфним через наявність SNP та інделів.

4.2. Анотація та визначення сайтів праймування

Як вже вказано вище, ген *chs_H1* анотовано, але позиції сайтів праймування не описані [71]. Ми виявили сайти праймування використаних в дослідженні праймерів за допомогою програми Vector-NTI 11. На рис 4.2 наведено схему організації гена *chs_H1* з відзначеними сайтами праймування для дослідження різних регіонів даного гена.

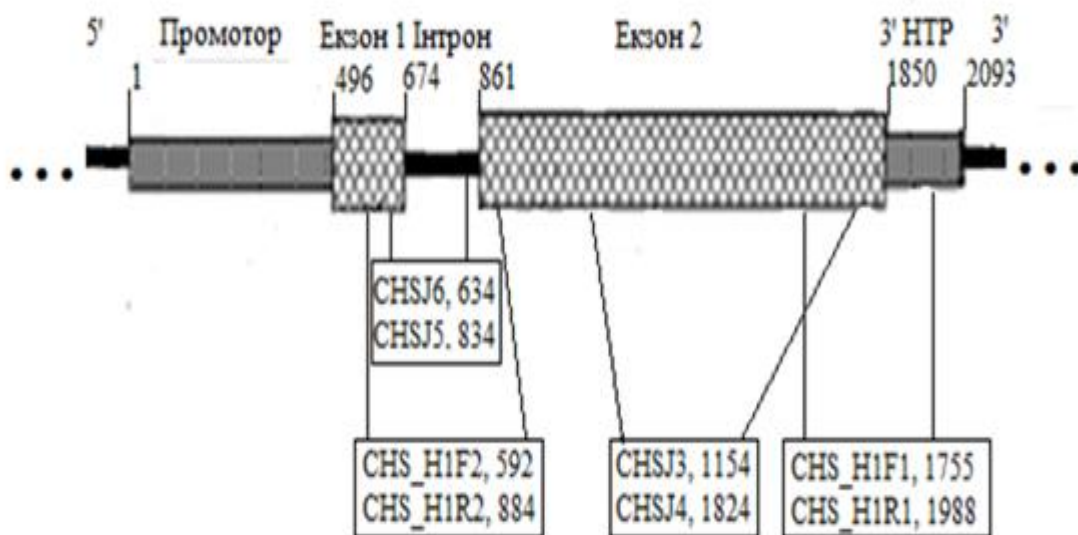


Рис. 4.2. Схема організації гена *chs_H1*, що кодує «істинну» халконсинтазу (позиції 1-2093 відповідно послідовності AJ304877) [71] з нашими модифікаціями. У прямокутниках позначено назви праймерів та позиції сайтів праймування. 3'-НТР – 3'-кінцевий нетрансльований регіон

Проводили анотацію генів *chs2*, *chs3* та *chs4* за допомогою програми UGENE. На рис. 4.3 наведені схеми організації генів *chs2*, *chs3*, *chs4* хмелю

звичайного також з відзначеними сайтами праймування для дослідження різних регіонів даних генів.

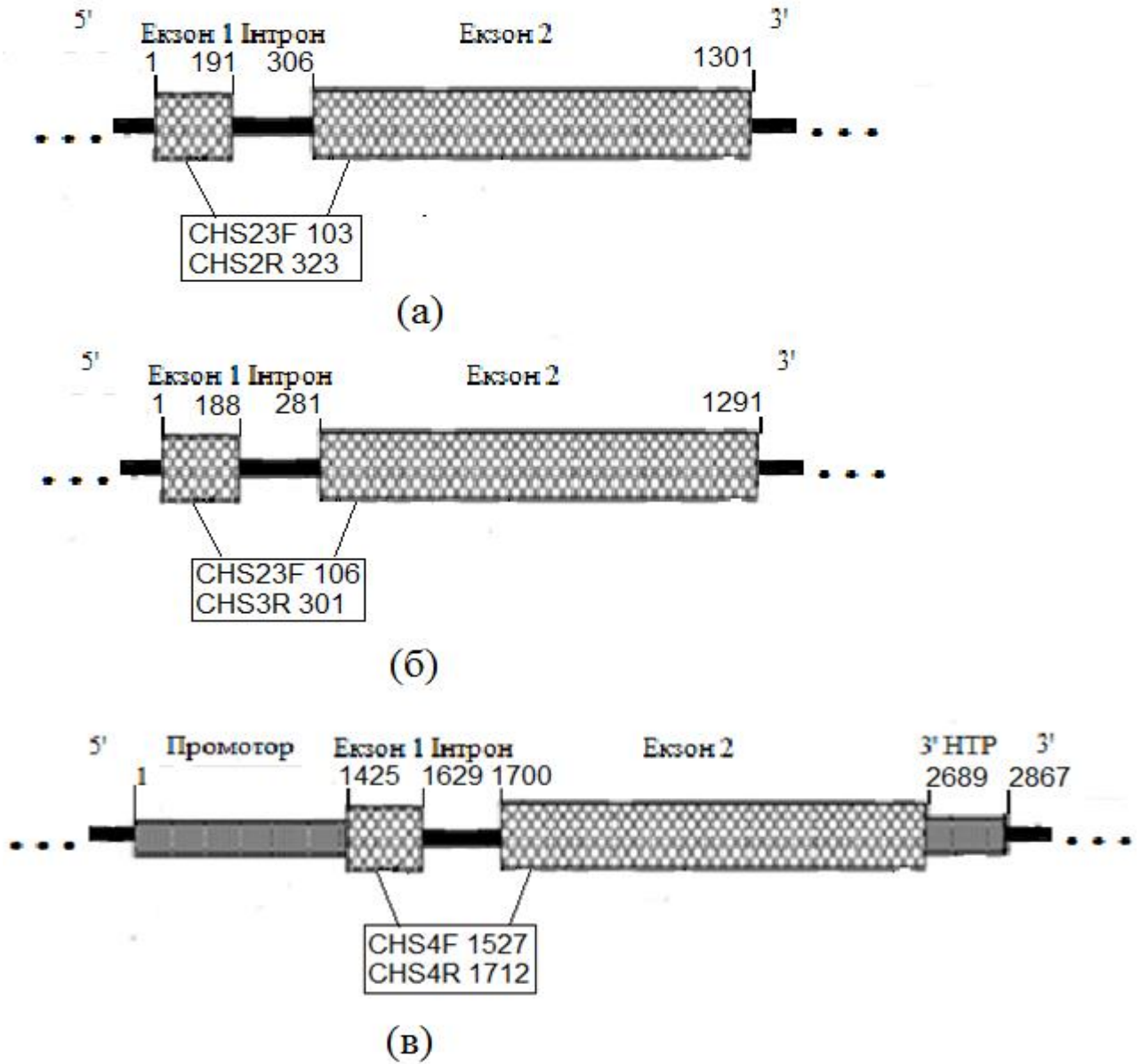


Рис. 4.3. Схеми організації генів хмелю звичайного: *chs2* (позиції 1-1301), відповідно послідовності АВ061020 (а); *chs3* (позиції 1-1291), відповідно послідовності АВ061022 (б); *chs4* (позиції 1-2867), відповідно послідовності АJ430353 (в). У прямокутниках позначено назви праймерів та позиції сайту праймування

Склад генів *chs2*, *chs3* та *chs4* описаний [87], проте невідомими залишались розміри складових частин даних генів, що також встановлено нами та наведено на рис. 3.3.

Як вже підкреслювалося вище, ген *vps* анотовано [87]. Нами визначено сайти праймування при дослідженні різних регіонів даного гена. На рис 4.4 наведено схему організації гена *vps* відзначеними сайтами праймування для дослідження різних регіонів даного гена.

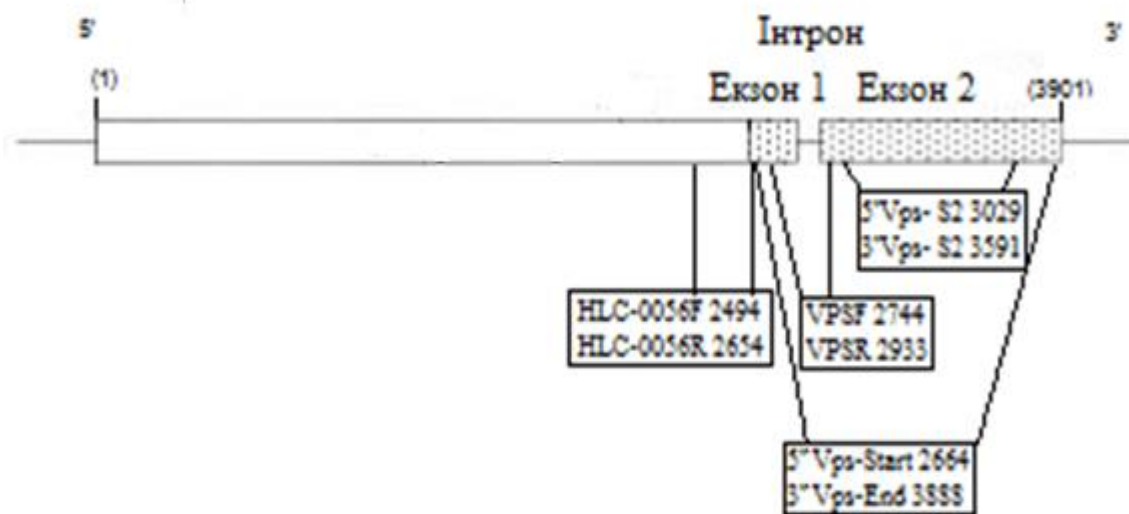


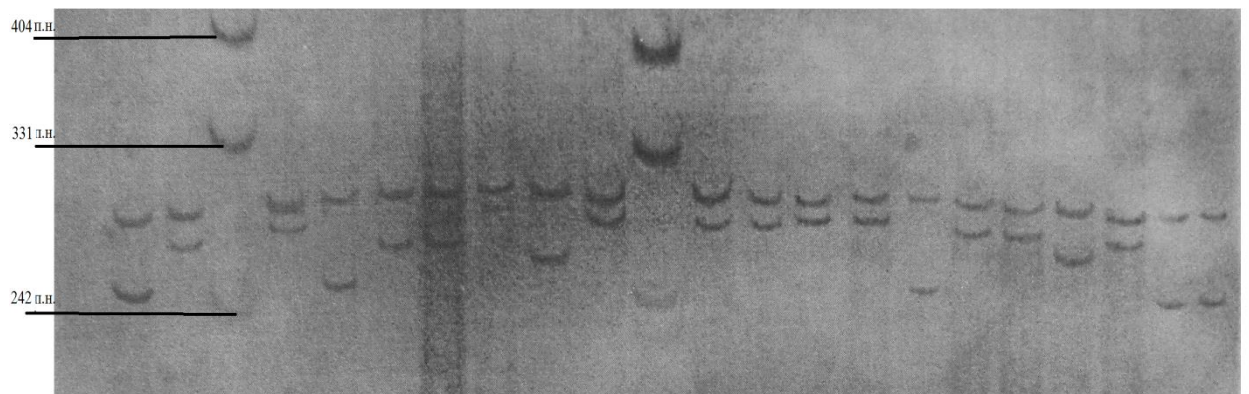
Рис. 4.4. Схема організації гена *vps*, що кодує валерофенонсинтазу хмелю звичайного. В прямокутниках позначено назви праймерів та позиції сайтів праймування (відповідно послідовності АВ047593) [86]. В скобках показані позиції гена

Таким чином, за результатами біоінформатичних досліджень досліджень анотовано гени *chs2*, *chs3* та *chs4* хмелю звичайного, показано наявність у кожного двох екзонів та інтрону, визначено їх розміри та показані позиції сайтів праймування використаних у нашій роботі праймерів для ПЛР-аналізу різних ділянок цих генів. Визначено розміри певних регіонів генів *chs_H1* та *vps* хмелю звичайного.

4.3. Поліморфізм розміру генів, що кодують халконсинтази, у сортів хмелю звичайного української селекції

Поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, досліджували за допомогою ПЛР *in vitro* на вибірці 20 сортів хмелю звичайного української селекції. Поліморфізм гена *chs_H1* досліджено у регіонах: 3'-НТР, екзон 2 та інтрон.

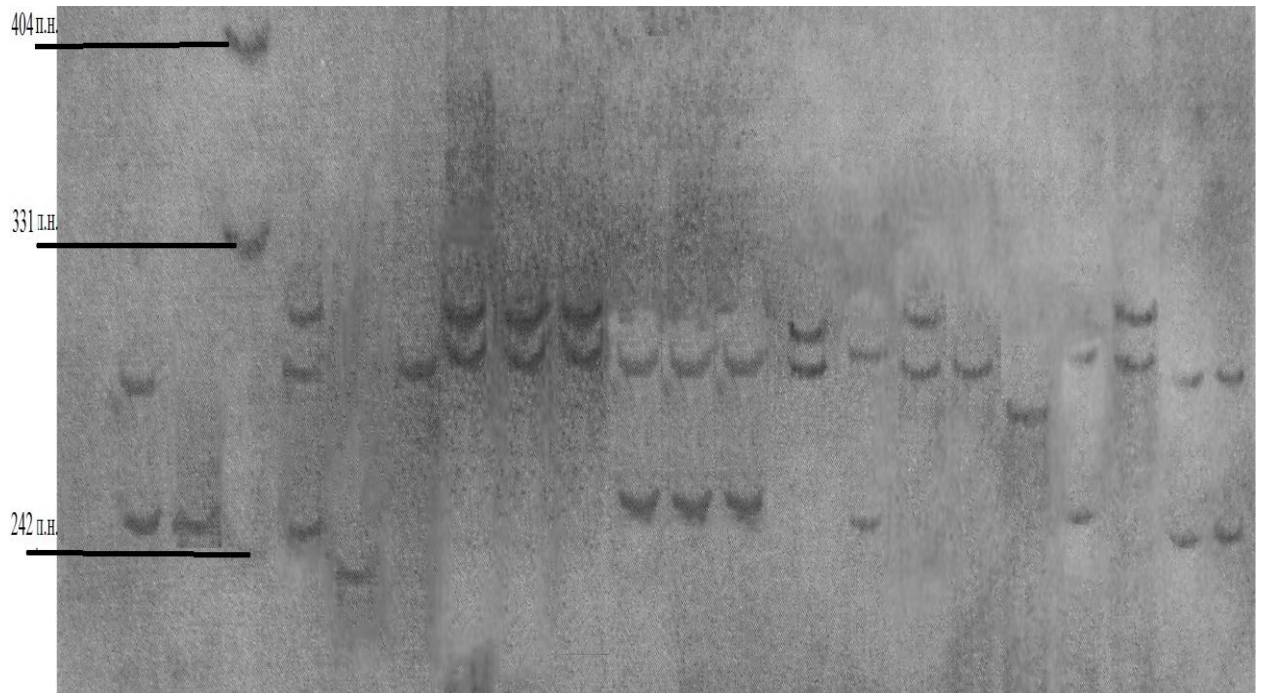
При дослідженні поліморфізму 3'-НТР гена *chs_H1* за допомогою ПЛР з парою праймерів CHS_H1F1/CHS_H1R1 виявлено чотири фрагменти ампліфікації розмірами 247, 255, 261, 267 п.н. (рис. 4.5). У літературі описані продукти ампліфікації розмірами 245, 255, 265 п.н. при дослідженні вибірки з 68 сортів хмелю звичайного світової колекції [96].



К 1 2 М 3 4 5 6 7 8 9 М 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
20

Рис. 4.5. Електрофореграма (10 % ПАА) продуктів ампліфікації 3'-НТР гена *chs_H1* сортів хмелю звичайного Альта (1), Видибор (2), Гайдамацький (3), Житомирський 75 (4), Заграва (5), Зміна (6), Клон 18 (7), Ксанта (8), Кумир (9), Надія (10), Назарій (11), Оболонський (12), Оскар (13), Пивовар (14), Полісянка (15), Поліський (16), Промінь (17), Славянка (18), Хмелеслав (19), Чаклун (20). К - контроль (ПЛР-суміш без ДНК). М – маркер молекулярної маси pUC19 DNA/MspI

При дослідженні поліморфізму інтрону гена *chs_H1* за допомогою ПЛР з парою праймерів CHS_H1F2/CHS_H1R2 виявлено п'ять фрагментів ампліфікації розмірами 234, 248, 253, 264, 272 п.н. (рис. 4.6). У літературі описаний продукт ампліфікації розміром 314 п.н. при дослідженні вибірки з 68 сортів хмелю звичайного світової колекції [96].



К 1 2 М 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Рис. 4.6. Електрофореграма (10 % ПАА) продуктів ампліфікації інтрону гена *chs_H1* Н1, отриманих за допомогою ПЛР з парою праймерів CHS_H1F2/CHS_H1R2, сортів хмелю звичайного Альта (1), Видибор (2), Гайдамацький (3), Житомирський 75 (4), Заграва (5), Зміна (6), Клон 18 (7), Ксанта (8), Кумир (9), Надія (10), Назарій (11), Оболонський (12), Оскар (13), Пивовар (14), Полісянка (15), Поліський (16), Промінь (17), Славянка (18), Хмелеслав (19), Чаклун (20). К - контроль (ПЛР-суміш без ДНК). М – маркер молекулярної маси pUC19 DNA/MspI

При дослідженні поліморфізму інтрону гена *chs_H1* за допомогою ПЛР з парою праймерів CHSJ6/CHSJ5 виявлений один продукт ампліфікації,

розміром 218 п.н. У літературі описані шість продуктів ампліфікації, розміри яких були в межах 260-400 п.н., при дослідженні вибірки з дев'ятьох чеських сортів хмелю звичайного [70].

При дослідженні поліморфізму екзону 2 гена *chs_H1* за допомогою ПЛР з парою праймерів CHSJ4/CHSJ3 виявлено два продукти ампліфікації розмірами 580 та 600 п.н. (рис. 4.7).

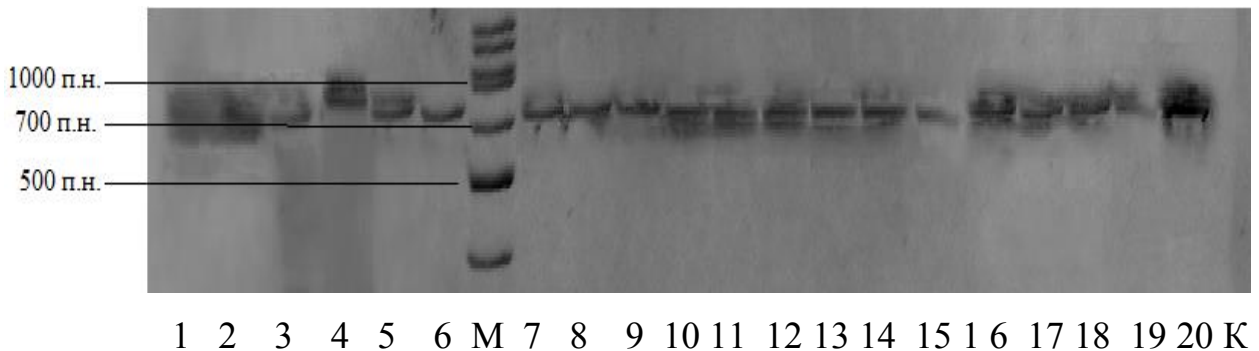


Рис. 4.7. Електрофореграма (10 % ПАА) продуктів ампліфікації екзона гена *chs_H1* сортів хмелю звичайного Альта (1), Видибор (2), Гайдамацький (3), Житомирський 75 (4), Заграва (5), Зміна (6), Клон 18 (7), Ксанта (8), Кумир (9), Надія (10), Назарій (11), Оболонський (12), Оскар (13), Пивовар (14), Полісянка (15), Поліський (16), Промінь (17), Славянка (18), Хмелеслав (19), Чаклун (20). К - контроль (ПЛР-суміш без ДНК). М – маркер молекулярної маси GeneRuler DNA Ladder mix.

Поліморфізм досліджених ділянок гена *chs_H1*, отриманий при ПЛР-аналізі сортів хмелю звичайного української селекції, узагальнено в табл. 4.1.

При дослідженні поліморфізму інтрону гена *chs2* за допомогою ПЛР з парою праймерів CHS23F/CHS2R виявлено три продукти ампліфікації розмірами 230, 237, 240 п.н. (рис. 4.8). У літературі описані продукти ампліфікації, виявлені за допомогою даних праймерів у вибірці 68 сортів хмелю звичайного світової колекції, розмірами 240, 260, 460 та 480 п.н. [96].

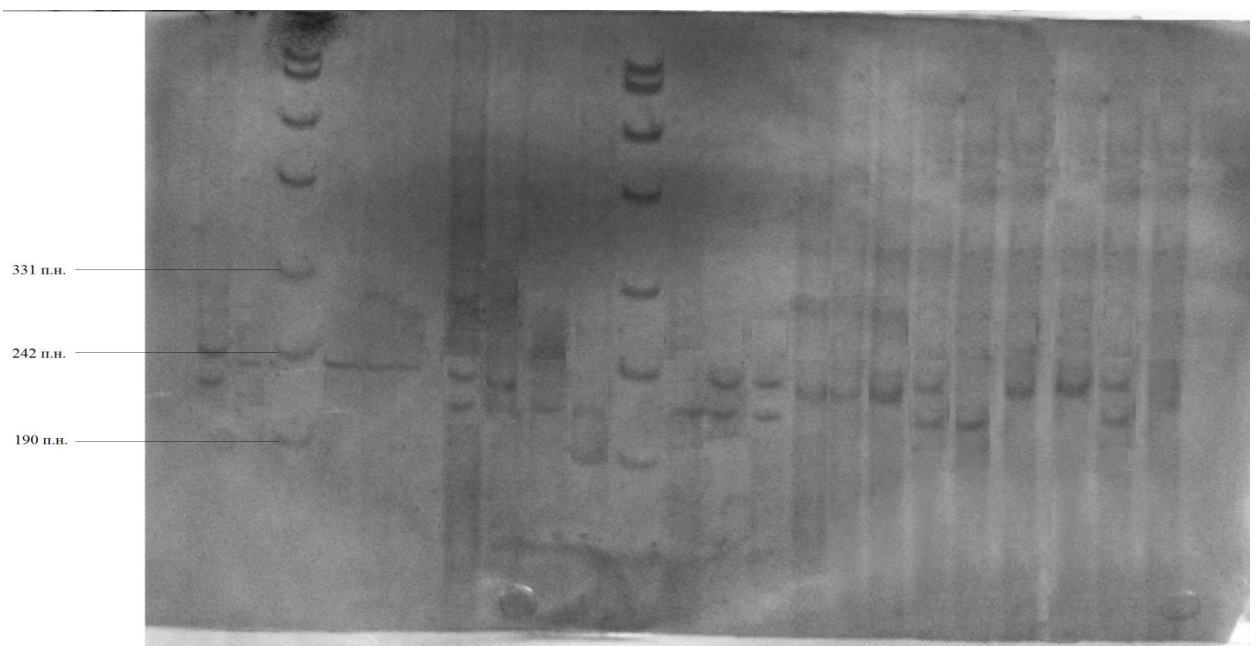
Таблиця 4.1

**Результати ПЛР-аналізу гена *chs_H1* у хмелю звичайного
української селекції**

Назва сорту хмелю звичайного	Розміри фрагментів ампліфікації регіонів гена <i>chs_H1</i> , п. н.			
	3'-НТР	інтрон		екзон 2
	при використанні пар праймерів			
	CHS_H1F1 CHS_H1R1	CHS_H1F2 CHS_H1R2	CHSJ6 CHSJ5	CHSJ3 CHSJ4
1	2	3	4	5
Альта	247, 267	248, 264	218, 218	580, 580
Видибор	255, 267	248, 248	218, 218	580, 580
Гайдамацький	261, 267, 267	248, 264, 272	218, 218, 218	580, 580, 580
Житомирський 75	247, 267	234, 234	218, 218	600, 600
Заграва	255, 267	264, 264	218, 218	580, 580
Зміна	255, 267	264, 272	218, 218	580, 580
Клон 18	261, 267	264, 272	218, 218	580, 580
Ксанта	255, 267	264, 272	218, 218	580, 580
Кумир	261, 267	248, 264	218, 218	580, 580
Надія	261, 267	248, 264	218, 218	580, 580
Назарій	261, 267	248, 264	218, 218	580, 580
Оболонський	261, 267	264, 272	218, 218	580, 580
Оскар	261, 267	248, 264	218, 218	580, 580
Пивовар	247, 267	264, 272	218, 218	580, 580
Полісянка	261, 267	264, 264	218, 218	580, 580
Поліський	261, 267	253, 253	218, 218	580, 580
Промінь	255, 267	248, 264	218, 218	580, 580

Продовження табл. 4.1

1	2	3	4	5
Славянка	261, 267	264, 272	218, 218	580, 580
Хмелеслав	247, 267	248, 264	218, 218	580, 580
Чаклун	247, 267	248, 264	218, 218	580, 580



К 1 2 М 3 4 5 6 7 8 9 М 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Рис. 4.8. Електрофореграма (10 % ПАА) продуктів ампліфікації інтрону гена *chs2* сортів хмелю звичайного Альта (1), Видибор (2), Гайдамацький (3), Житомирський 75 (4), Заграва (5), Зміна (6), Клон 18 (7), Ксанта (8), Кумир (9), Надія (10), Назарій (11), Оболонський (12), Оскар (13), Пивовар (14), Полісянка (15), Поліський (16), Промінь (17), Славянка (18), Хмелеслав (19), Чаклун (20). К - контроль (ПЛР-суміш без ДНК). М – маркер молекулярної маси рUC19 DNA/MspI

Результати дослідження поліморфізму інтрону гена *chs2*, отриманого при ПЛР-аналізі сортів хмелю звичайного української селекції, представлено у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Результати ПЛР-аналізу інтрону гена *chs2* у хмелю звичайного української селекції

Назва сорту хмелю звичайного	Розміри фрагментів ампліфікації, п.н.	Назва сорту хмелю звичайного	Розміри фрагментів ампліфікації, п.н.
Альта	230, 240	Назарій	230, 240
Видибор	237, 237	Оболонський	230, 240
Гайдамацький	237, 237, 237	Оскар	237, 237
Житомирський 75	237, 237	Пивовар	237, 237
Заграва	237, 237	Полісянка	237, 237
Зміна	230, 240	Поліський	230, 240
Клон 18	237, 237	Промінь	230, 230
Ксанта	230, 230	Славянка	237, 237
Кумир	230, 230	Хмелеслав	237, 237
Надія	230, 230	Чаклун	230, 240

При дослідженні поліморфізму інтрону гена *chs3* у сортів хмелю звичайного української селекції за допомогою ПЛР з парою праймерів CHS23F/CHS3R виявлений один продукт ампліфікації розміром 232 п.н. У літературі описаний продукт ампліфікації, виявлений за допомогою ПЛР з даними праймерами на виборці 68 сортів хмелю звичайного світової колекції, розміром 217 п.н. [96].

При дослідженні поліморфізму інтрону гена *chs4* за допомогою ПЛР з парою праймерів CHS4F/CHS4R у сортів хмелю звичайного української селекції виявлений один продукт ампліфікації розміром 223 п.н. У літературі описаний продукт ампліфікації, виявлений за допомогою ПЛР з даними праймерами на виборці 68 сортів хмелю звичайного світової колекції, розміром 207 п.н. [96].

За допомогою ПЛР-аналізу досліджено поліморфізм гена *vrs* у промоторі, ділянці, що включає екзон 1, інтрон і екзон 2, інтроні та екзоні 2. При дослідженні поліморфізму промотору за допомогою ПЛР з парою праймерів HLC-005BF/HLC-005BR виявлено продукти розмірами 165, 175, 178, 180, 185, 188 та 191 п.н. (рис. 4.9). У літературі описані продукти ампліфікації розмірами в діапазоні 180-210 п.н., отримані при аналізі 24 сортів (європейських, північноамериканських, казахстанського) [17].

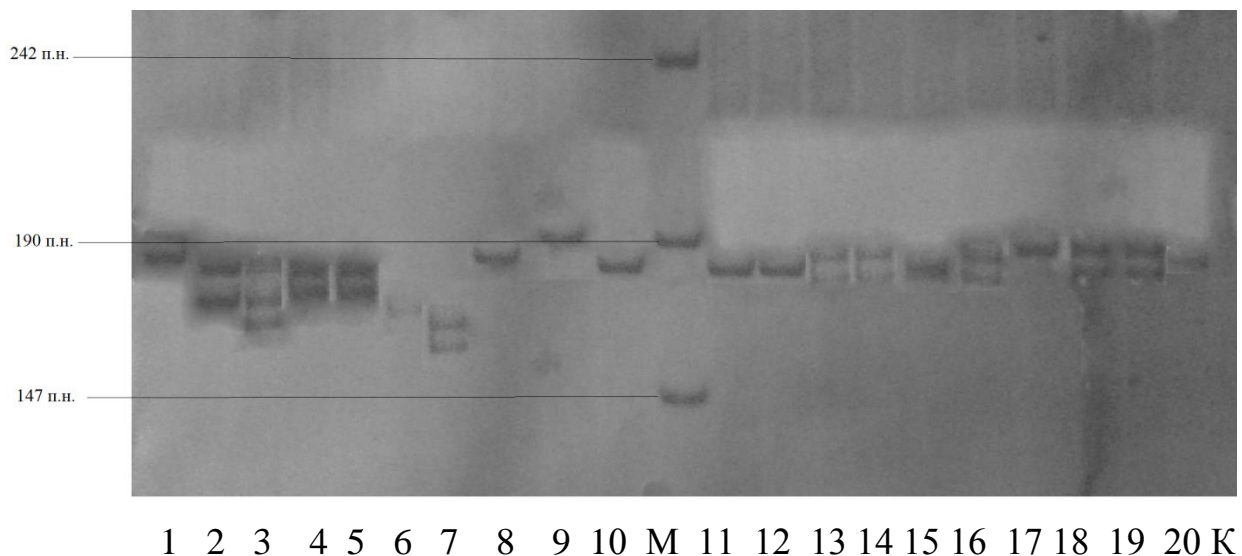


Рис. 4.9. Електрофореграма (10 % ПАА) продуктів ампліфікації промотору гена *vrs* сортів хмелю звичайного Альта (1), Видибор (2), Гайдамацький (3), Житомирський 75 (4), Заграва (5), Зміна (6), Клон 18 (7), Ксанта (8), Кумир (9), Надія (10), Назарій (11), Оболонський (12), Оскар (13), Пивовар (14), Полісянка (15), Поліський (16), Промінь (17), Славянка (18), Хмелеслав (19), Чаклун (20). К - контроль (ПЛР-суміш без ДНК). М – маркер молекулярної маси pUC19 DNA/MspI

При дослідженні поліморфізму регіону «екзон 1, інтрон, екзон 2» гена *vps* за допомогою ПЛР з парою праймерів 5'Vps-Start/3'Vps-End виявлено продукти ампліфікації розмірами 917 та 1303 п.н. (рис. 4.10). У літературі описаний продукт ампліфікації розміром 1269 п.н., отриманий при дослідженні 12 австралійських сортів хмелю звичайного [23].

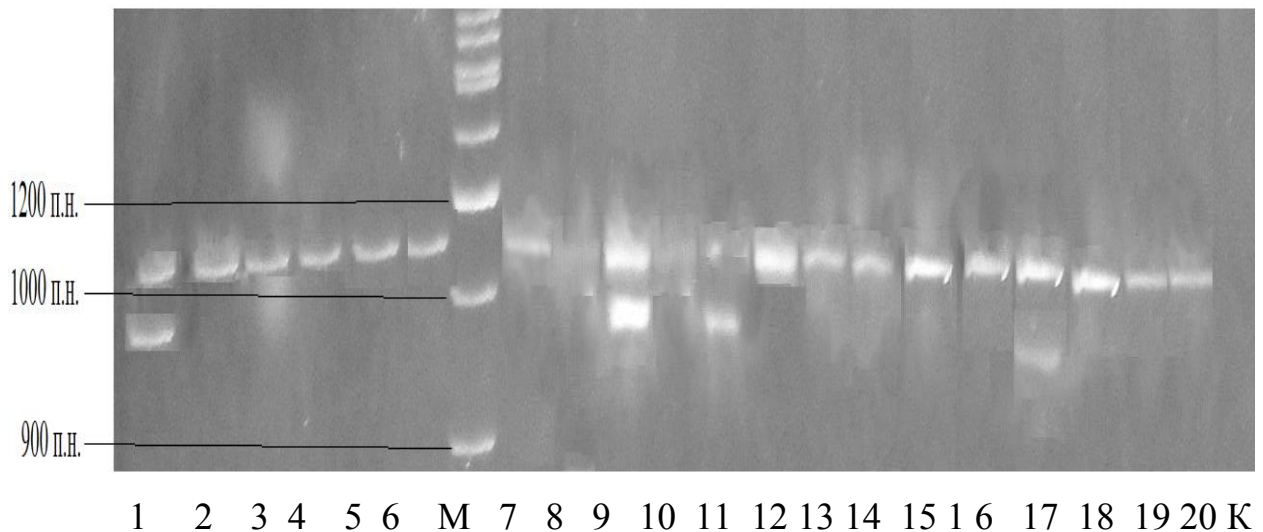


Рис. 4.10. Електрофореграма (10 % ПАА) продуктів ампліфікації локусу «екзон 1, інтрон, екзон 2» гена *vps* сортів хмелю звичайного Альта (1), Видибор (2), Гайдамацький (3), Житомирський 75 (4), Заграва (5), Зміна (6), Клон 18 (7), Ксанта (8), Кумир (9), Надія (10), Назарій (11), Оболонський (12), Оскар (13), Пивовар (14), Полісянка (15), Поліський (16), Промінь (17), Славянка (18), Хмелеслав (19), Чаклун (20). К - контроль (ПЛР-суміш без ДНК). М – маркер молекулярної маси GeneRuler DNA Ladder mix.

При дослідженні поліморфізму інтрону гена *vps* за допомогою ПЛР з парою праймерів VPSF/VPSR виявлено один продукт ампліфікації розміром 211 п.н. У літературі також описаний один 211 п.н. продукт ампліфікації, отриманий при дослідженні поліморфізму інтрону гена *vps* у 68 сортів хмелю звичайного світової колекції [96].

При дослідженні поліморфізму екзону 2 гена *vps* за допомогою ПЛР з парою праймерів 5'Vps-S2/3'Vps-S2 виявлений один продукт ампліфікації розміром 402 п.н. У літературі описаний продукт ампліфікації розміром 582 п.н., отриманий при дослідженні 12 австралійських сортів хмелю звичайного [23].

Таким чином, за допомогою ПЛР-аналізу досліджено поліморфізм гена *vps* у промоторі, інтроні, екзоні 2 та ділянці, що включає екзон 1, інтрон і екзон 2. Результати молекулярно-генетичного дослідження гена *vps* сортів хмелю звичайного української селекції наведено в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Результати ПЛР-аналізу гена *vps* у хмелю звичайного української селекції

Назва сорту	Розміри фрагментів ампліфікації регіонів гена <i>vps</i> , п. н.			
	промотор	екзон 1, інтрон, екзон 2	інтрон	екзон 2
	при використанні пар праймерів			
	HLC-005BF HLC-005BR	5'Vps-Start 3'Vps-End	VPSF VPSR	5'Vps- S2 3'Vps- S2
1	2	3	4	5
Альта	188, 188	917, 1303	211, 211	402, 402
Видибор	178, 185	1303, 1303	211, 211	402, 402
Гайдамацький	175, 178, 185	1303, 1303, 1303	211, 211, 211	402, 402, 402
Житомирський 75	178, 185	1303, 1303	211, 211	402, 402

Продовження табл. 4.3

1	2	3	4	5
Заграва	178, 185	1303, 1303	211, 211	402, 402
Зміна	180, 180	1303, 1303	211, 211	402, 402
Клон 18	165, 175	1303, 1303	211, 211	402, 402
Ксанта	180, 180	1303, 1303	211, 211	402, 402
Кумир	191, 191	917, 1303	211, 211	402, 402
Надія	180, 180	1303, 1303	211, 211	402, 402
Назарій	180, 180	917, 1303	211, 211	402, 402
Оболонський	180, 180	1303, 1303	211, 211	402, 402
Оскар	178, 185	1303, 1303	211, 211	402, 402
Пивовар	178, 185	1303, 1303	211, 211	402, 402
Поліський	180, 180	1303, 1303	211, 211	402, 402
Полісянка	178, 185	1303, 1303	211, 211	402, 402
Промінь	188, 188	917, 1303	211, 211	402, 402
Славянка	175, 185	1303, 1303	211, 211	402, 402
Хмелеслав	175, 185	1303, 1303	211, 211	402, 402
Чаклун	180, 180	1303, 1303	211, 211	402, 402

У більшості випадків сорти хмелю звичайного української селекції мають іншу кількість та розмір фрагментів ампліфікації, ніж описані сорти хмелю інших вибірок. Найбільш консервативним є досліджений регіон інтрону гена *vrp*, який є однаковим за розміром у сортів української та світової селекції.

За даними наших досліджень та літературних даних щодо поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, в інтроні, екзоні 2 та 3'-НТР гена *chs_H1*, інтронах генів *chs2*, *chs3* та *chs4*, промоторі, екзоні 1, інтроні та екзоні 2 гена *vrp* у 20 сортів хмелю звичайного української селекції та 68

сортів світової селекції проведений кластерний аналіз за методом UPGMA. За результатом аналізу побудована дендрограма (рис. 4.11).

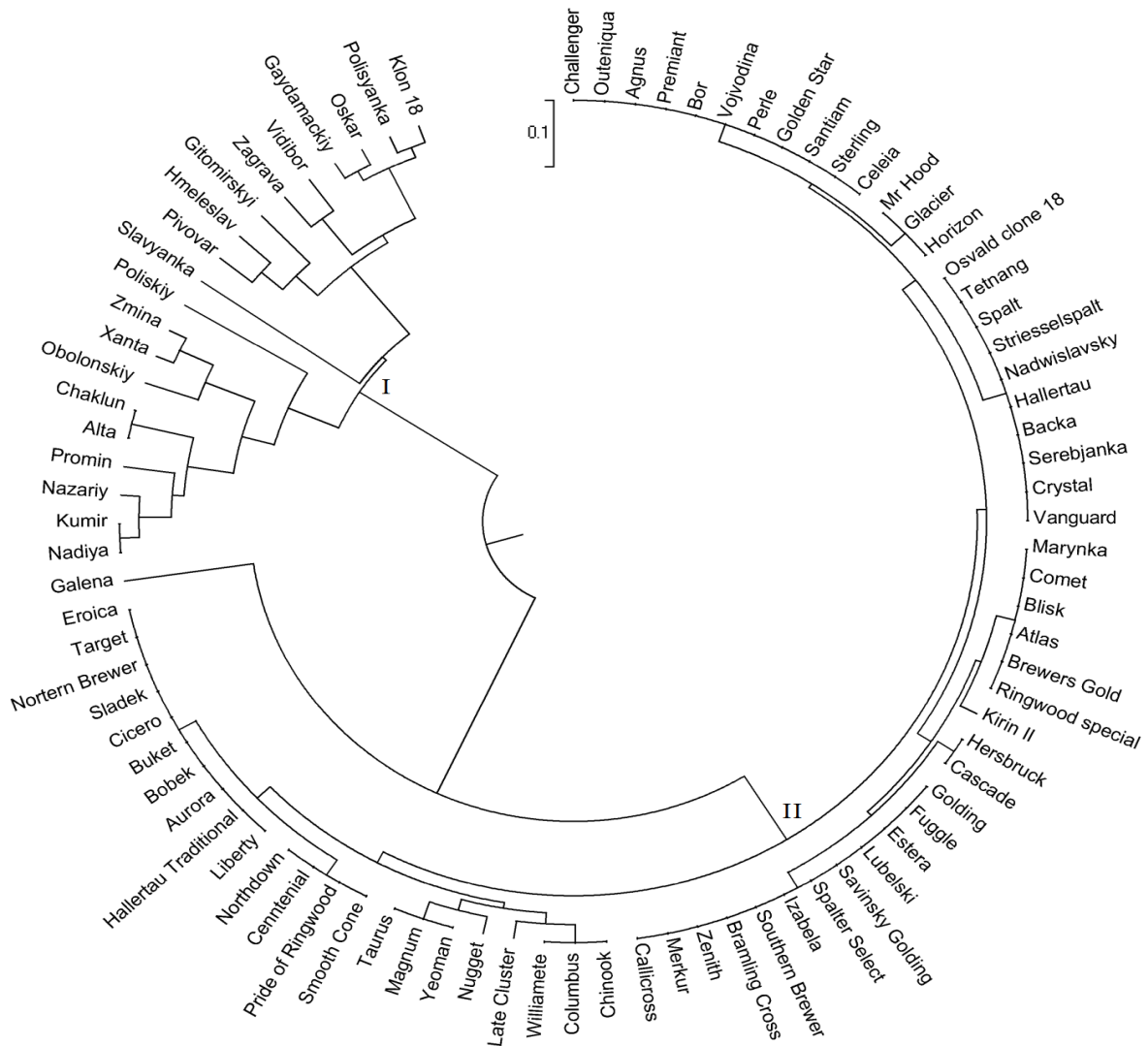


Рис. 4.11. Генетичне різноманіття сортів хмелю звичайного української та світової селекції, основане на поліморфізмі генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *ups*. Через специфіку програми назви сортів української селекції наведені латинськими буквами (Alta – Альта, Chaklun – Чаклун, Gaydamackiy – Гайдамацький, Gitomirsky – Житомирський 75, Hmeleslav – Хмелеслав, Klon 18 – Клон 18, Kumir – Кумир, Nadiya – Надія, Nazariy – Назарій, Obolonskiy – Оболонський, Oskar – Оскар, Pivovar – Пивовар, Poliskiy – Поліський, Polisyanka – Полісянка, Promin – Промінь, Vidibor – Видибор, Zagrava – Заграва, Slavyanka – Славянка, Zmina – Зміна, Xanta – Ксанта). I та II – кластери

Слід відзначити, що пошук в літературних джерелах не виявив робіт, в яких узагальнено інформацію молекулярно-генетичного поліморфізму різних регіонів генів, що кодують халконсинтази. Отже, наш аналіз сумарних даних поліморфізму різних ділянок різних генів, що кодують халконсинтази, проведено вперше.

На дендрограмі утворено два кластери. До одного кластеру увійшли сорти хмелю звичайного української селекції, до іншого – світової. Окремою гілкою представлений сорт Galena.

До кожної групи кожного з субкластеру кластера II увійшли сорти різних географічних груп, тобто груп сортів, різних за географічним місцем створення. Відсутність можливості ідентифікації географічного походження сортів даних груп свідчить про використання одних, або схожих зразків хмелю звичайного при їх селекції. Виділення всіх українських сортів хмелю звичайного в окремий кластер може свідчити про використання специфічних (невідомого, складного або гібридного селекційного походження та добраних з місцевих сортопопуляцій) зразків, зокрема чоловічих, при селекції даних сортів.

Слід відзначити, що у даній дендрограмі відбувається кластеризація сортів хмелю звичайного української селекції за типом. Проте не відбувається повної диференціації сортів. Так, сорти Кумир і Надія, а також Чаклун і Альта знаходяться в одних гілках дендрограми. Використання поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, у інтроні, екзоні 2 та 3'-НТР гена *chs_H1*, інтронах генів *chs2*, *chs3* та *chs4*, промоторі, екзоні 1, інтроні та екзоні 2 гена *vps* дозволяє виявити тип сорту, проте не проводить диференціацію сортів.

Отже, проведено вирівнювання всіх наявних на той час в базі даних GenBank NCBI нуклеотидних послідовностей генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* та визначений їх поліморфізм. Проведена анотація генів *chs2*, *chs3* та *chs4*, встановлено розміри регіонів даних генів. Показані позиції сайтів

праймування використаних у нашій роботі праймерів для ПЛР-аналізу генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*.

Досліджений поліморфізм генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* на виборці сортів хмелю звичайного української селекції. Виявлені продукти ампліфікації іншого розміру, ніж описані в літературі. Показаний поліморфізм ділянок, що вважались неpolіморфними за розміром.

Результати молекулярно-генетичних досліджень генів, що кодують халконсинтази, у українських сортів відрізняються від досліджень даних генів у сортів хмелю звичайного інших географічних груп. Порівняння результатів наших досліджень поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, з літературними даними наведено у табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Порівняння поліморфізму генів, що кодують халконсинтази у сортів хмелю звичайного української та іншої селекції

Ген, регіон, позиції	Продукти ампліфікації (п. н.) при дослідженні сортів хмелю звичайного				
	20 сортів української селекції ¹	68 сортів світової колекції ²	9 сортів чеської селекції ³	24 зразків світової колекції ⁴	12 сортів австралійської селекції ⁵
1	2	3	4	5	6
<i>chs_H1</i> , інтрон, 592-884	234, 248, 253, 264, 272	314	-	-	-

Продовження табл. 4.4

1	2	3	4	5	6
інтрон гена <i>chs_H1</i> , позиції 634- 834	218	-	240-400	-	-
екзон 2 гена <i>chs_H1</i>	580, 600	-	Дані відсутні	-	-
3'НТР гена <i>chs_H1</i>	247, 255, 261, 267	245, 255, 265	-	-	-
інтрон гена <i>chs2</i>	230, 237, 240	240, 260, 460, 480	-	-	-
інтрон гена <i>chs3</i>	217	232 .	-	-	-
інтрон гена <i>chs4</i>	207	223	-	-	-
інтрон гена <i>vps</i>	211	211	-	-	-
промотор гена <i>vps</i> ,	165, 175, 178, 180, 185, 188, 191	-	-	180-210	-

Продовження табл. 4.4

1	2	3	4	5	6
екзон 1, інтрону та екзон 2 гена <i>vps</i>	917, 1303	-	-	-	1269
екзон 2 гена <i>vps</i>	582	-	-	-	402

Примітка: ¹ – результати даної роботи; ² – дослідження [96]; ³ – дослідження [70]; ⁴ – дослідження [18]; ⁵ – дослідження [24]; « - » – дослідження не проводили

У літературі описана панель 13 мікросателітних маркерів для ДНК типування сортів хмелю звичайного української селекції [6, 10]. В ідентифікаційній формулі сорту буква англійського алфавіту означає досліджений локус, нижній індекс – розміри фрагментів ампліфікації даного локусу в п. н. (у випадку гомозиготного стану вказують один фрагмент). Літери А, В, С, D, Е, F, G, H, I, J, K, L, M означають локуси 11a59, 7a82, 3a88, 5-2, HIGA29, HIGA4, HIGA9, HIGT4, HIGT5, HIGT9, HIGA3, HIGT1, HIGT2, відповідно. За результатами наших досліджень формули доповнено даними аналізу генів, що кодують халконсинтази, яким надано такі коди: N - 3'-нетрансльований регіон, O – інтрон (позиції 592-884), P – інтрон (позиції 634-834), Q - екзон 2 гена *chs_H1*; R - інтрон гена *chs2*; S – інтрон гена *chs3*; T - інтрон гена *chs4*; U - промотор, V - інтрон, W - екзон 2, X - ділянка, що включає екзон 1, інтрон і екзон 2, гена *vps* (табл. 4.5).

Таким чином, при дослідженні поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, у хмелю звичайного української селекції виявлені нові продукти ампліфікації та виявлений поліморфізм локусів, що вважалися неpolіморфними.

Таблиця 4.5

Генетичні формули сортів хмелю звичайного

Сорт	Формула
1	2
Пивовар	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{247,267}O_{264,272}P_{218}Q_{580}R_{237}S_{232}T_{223}U_{178,185}V_{211}W_{402}X_{1303}$
Альта	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{247,267}O_{248,264}P_{218}Q_{580}R_{230,240}S_{232}T_{223}U_{188}V_{211}W_{402}X_{917,1303}$
Зміна	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{255,267}O_{264,272}P_{218}Q_{580}R_{230,240}S_{232}T_{223}U_{180}V_{211}W_{402}X_{1303}$
Промінь	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{255,267}O_{248,264}P_{218}Q_{580}R_{240}S_{232}T_{223}U_{188}V_{211}W_{402}X_{917,1303}$
Оболонський	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{261,267}O_{264,272}P_{218}Q_{580}R_{230,240}S_{232}T_{223}U_{180}V_{211}W_{402}X_{1303}$
Гайдамацький	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{261,267,267}O_{248,264,272}P_{218}Q_{580}R_{237}S_{232}T_{223}U_{175,178,185}V_{211}W_{402}$ X_{1303}
Хмелеслав	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{247,267}O_{248,264}P_{218}Q_{580}R_{237}S_{232}T_{223}U_{175,185}V_{211}W_{402}X_{1303}$
Славянка	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{261,267}O_{264,272}P_{218}Q_{580}R_{237}S_{232}T_{223}U_{175,185}V_{211}W_{402}X_{1303}$
Кумир	$A_{194}B_{198}C_{194}D_{186}E_{186}F_{228,230}G_{201}H_{195}I_{204}J_{200}K_{150}L_{262}M_{212,220}$ $N_{261,267}O_{248,264}P_{218}Q_{580}R_{230}S_{232}T_{223}U_{191}V_{211}W_{402}X_{917,1303}$

Продовження табл. 4.5

1	2
Клон 18	A ₁₉₄ B ₁₉₈ C ₁₉₄ D ₁₈₆ E ₁₈₆ F _{228,230} G ₂₀₁ H ₁₉₅ I ₂₀₄ J ₂₀₀ K ₁₅₀ L ₂₆₂ M _{212,220} N _{261,267} O _{264,272} P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R ₂₃₇ S ₂₃₂ T ₂₂₃ U _{165,175} V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Житомирський 75	A ₁₉₄ B ₁₉₈ C ₁₉₄ D ₁₈₆ E ₁₈₆ F _{228,230} G ₂₀₁ H ₁₉₅ I ₂₀₄ J ₂₀₀ K ₁₅₀ L ₂₆₂ M _{212,220} N _{247,267} O ₂₃₄ P ₂₁₈ Q ₆₀₀ R ₂₃₇ S ₂₃₂ T ₂₂₃ U _{178,185} V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Заграва	A ₁₉₄ B ₁₉₈ C ₁₉₄ D ₁₈₆ E ₁₈₆ F _{228,230} G ₂₀₁ H ₁₉₅ I ₂₀₄ J ₂₀₀ K ₁₅₀ L ₂₆₂ M _{212,220} N _{255,267} O ₂₆₄ P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R ₂₃₇ S ₂₃₂ T ₂₂₃ U _{178,185} V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Видибор	N _{255,267} O ₂₄₈ P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R ₂₃₇ S ₂₃₂ T ₂₂₃ U _{178,185} V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Ксанта	N _{255,267} O _{264,272} P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R ₂₃₀ S ₂₃₂ T ₂₂₃ U ₁₈₀ V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Надія	N _{261,267} O _{248,264} P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R ₂₃₀ S ₂₃₂ T ₂₂₃ U ₁₈₀ V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Назарій	N _{261,267} O _{248,264} P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R _{230,240} S ₂₃₂ T ₂₂₃ U ₁₈₀ V ₂₁₁ W ₄₀₂ X _{917,1303}
Оскар	N _{261,267} O _{248,264} P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R ₂₃₇ S ₂₃₂ T ₂₂₃ U _{178,185} V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Полісянка	N _{261,267} O ₂₆₄ P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R ₂₃₇ S ₂₃₂ T ₂₂₃ U _{178,185} V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Поліський	N _{261,267} O ₂₅₃ P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R _{230,240} S ₂₃₂ T ₂₂₃ U ₁₈₀ V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃
Чаклун	N _{247,267} O _{248,264} P ₂₁₈ Q ₅₈₀ R _{230,240} S ₂₃₂ T ₂₂₃ U ₁₈₀ V ₂₁₁ W ₄₀₂ X ₁₃₀₃

Примітка: А – J [8], К – М [5], N – U - наші дослідження

Таким чином, при дослідженні поліморфізму генів, що кодуєть халконсинтази, у хмелю звичайного української селекції виявлені нові продукти ампліфікації та виявлений поліморфізм локусів, що вважалися

неполіморфними. Панель з 13 мікросателітних маркерів для ДНК-типуння сортів хмелю звичайного української селекції доповнено даними щодо генів, які кодують халконсинтази.

Результати розділу опубліковано у таких роботах:

1) Кожухова Н.Е. Сучасні молекулярно-генетичні дослідження хмелю (огляд) / Н.Е. Кожухова, А.М. Венгер, Ю.М. Сиволап, Б.Ф. Кормільцев // Збірник «Агропромислове виробництво Полісся». - 2011. – Вип. 4. – С. 62-67.

2) Венгер А.М. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *chs2*, *chs3* та *chs4* у сортів хмеля звичайного української селекції / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Вісник Запорізького національного університету. – 2014. – № 1. – С. 13-21.

3) Venger A. Molecular-genetic polymorphism of *vps* gene in Ukrainian hop varieties / A. Venger, N. Volkova // Modern science. – 2014. – Vol. 1. – P. 28-34.

4) Венгер А.М. Ген валерофенонсинтази хмелю. Біоінформатичний аналіз / А.М. Венгер, Н.Е. Кожухова, Г.І. Сліщук // Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». - 2011. - Т. 10. - С. 187-190.

5) Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетична оцінка сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) / Ю.М. Сиволап, Н.Е. Волкова, О.О. Захарова, Г.Ю. Шевчук, А.М. Венгер // Методичні рекомендації. – Одеса: КП ОМД. – 2012. – 18 с.

6) Венгер А.М. Оцінка генотипу хмелю звичайного за генами, що кодують халконсинтази, статтю та ураженістю бактеріальним раком / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур: тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених. – Одеса, 28-30.10. 2014 р. – С. 72.

7) Венгер А.М. Поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, та його зв'язок з рівнем гірких речовин шишок хмелю звичайного / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України – 2015. – № 2. – С. 1-9.

РОЗДІЛ 5

ЗВ'ЯЗОК МІЖ ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ХАЛКОНСИНТАЗИ, ТА РІВНЕМ ГІРКИХ РЕЧОВИН У ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО

Сорти хмелю звичайного за вмістом та співвідношенням гірких речовин когумулону та колупулону поділяють на гіркі та ароматичні [10]. Гіркі сорти більше використовуються в харчовій промисловості, а ароматичні – в парфумерній та фармацевтичній [31, 36].

Виявлення типу сорту зазвичай проводиться біохімічними методами, з використанням газової хроматографії [61-63]. Виявлення кількості та співвідношення когумулону та колупулону можливе у зразка хмелю звичайного віком не менше 1,5 років, адже молодший зразок не набирає гірких та ароматичних речовин у достатній кількості для ідентифікування типу сорту.

Використання біохімічних методів для виявлення типу сорту є довготривалим та дорогим методом, тому доцільним є розробка більш швидких та дешевих підходів [101]. Одним із перспективних методів визначення рівня гірких речовин та сортової ідентифікації зразків хмелю звичайного є метод, оснований на ПЛР.

За даними молекулярно-генетичних досліджень поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, наведених у розділі 3, у 20 сортів хмелю звичайного української селекції проведено кластерний аналіз та побудовано дендрограму за методом UPGMA (рис. 5.1).

Для оцінювання належності зразка хмелю звичайного до певного кластеру, виходячи із вирогідності находження кожного окремого показника в кожній конкретній позиції, використовували метод MCLM (рис. 5.2).

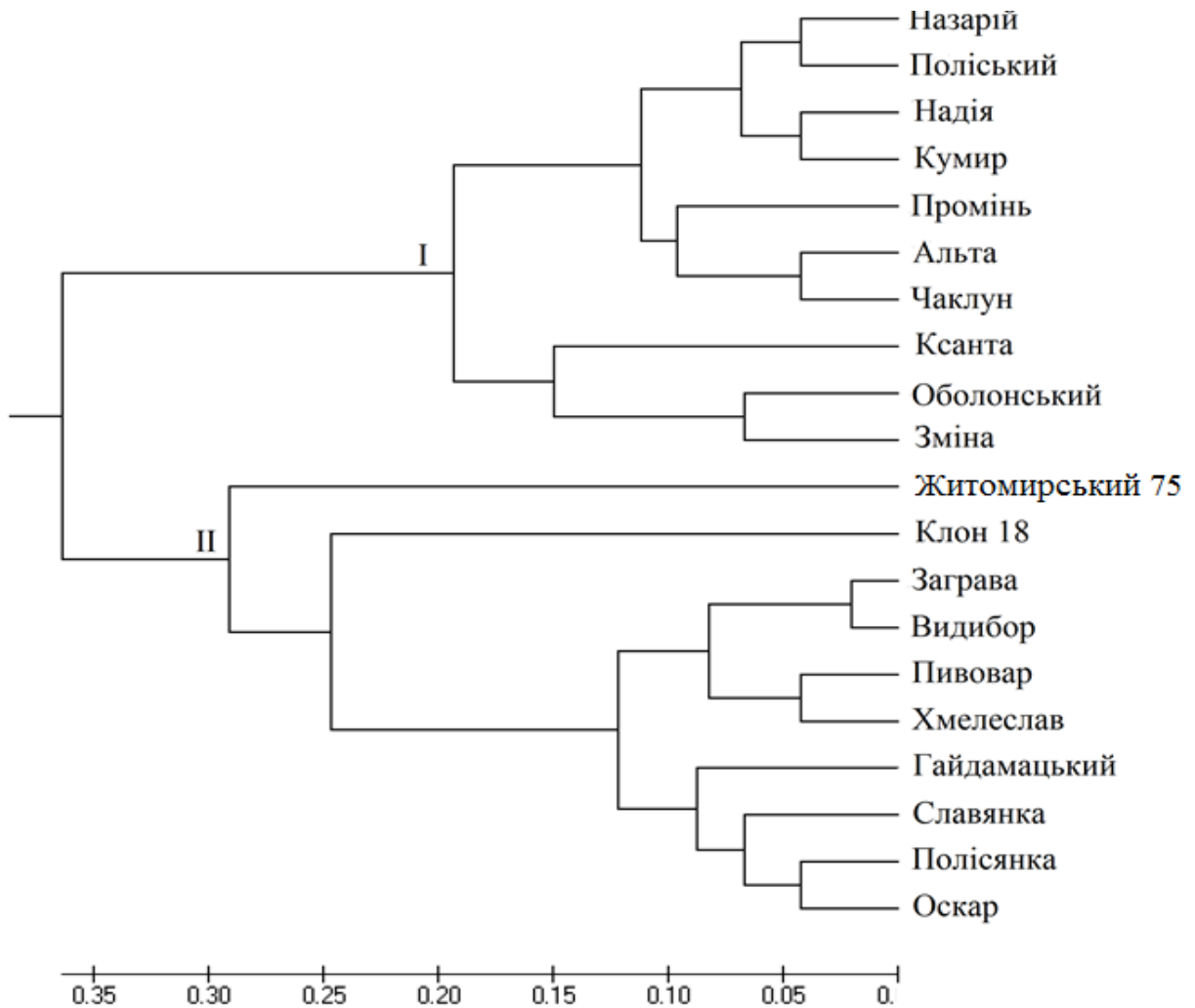


Рис. 5.1. Генетичне різноманіття сортів хмелю звичайного української селекції, основане на поліморфізмі генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, визначене за методом UPGMA. I, II – кластери

За результатом аналізу за методом UPGMA відбувається чітка кластеризація сортів за їх типом. До кластеру I увійшли всі гіркі сорти, до кластеру II – всі ароматичні.

Дендрограма, побудована за результатом аналізу сортів хмелю звичайного за вмістом гірких речовин за методом UPGMA, складається з двох кластерів. До кластеру I увійшли гіркі сорти, до кластеру II – ароматичні. Слід відзначити, що дендрограма, побудована за аналізом вмісту гірких речовин сортів хмелю звичайного української селекції за методом

UPGMA відрізняється від дендрограми, побудованої за поліморфізмом генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, хоча у обох дендрограмах ароматичні та гіркі сорти увійшли до різних кластерів (рис. 5.1-2).

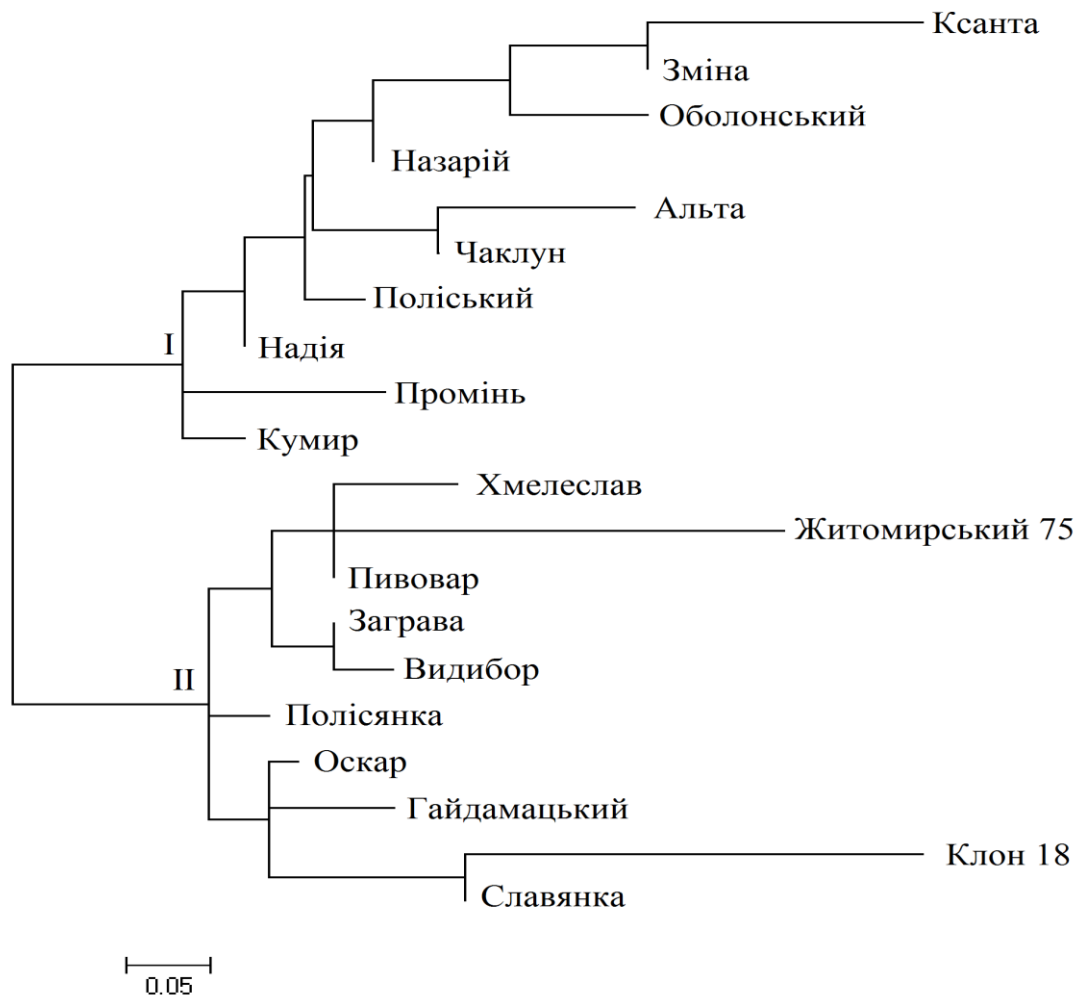


Рис. 5.2. Генетичне різноманіття сортів хмелю звичайного української селекції, основане на поліморфізмі генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, визначене за методом MCLM. I, II – кластери

Дендрограма, побудована за результатом аналізу сортів хмелю звичайного за вмістом гірких речовин за методом UPGMA, складається з двох кластерів. До кластеру I увійшли гіркі сорти, до кластеру II – ароматичні. Слід відзначити, що дендрограма, побудована за аналізом вмісту гірких речовин сортів хмелю звичайного української селекції за методом

UPGMA відрізняється від дендрограми, побудованої за поліморфізмом генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, хоча у обох дендрограмах ароматичні та гіркі сорти увійшли до різних кластерів (рис. 5.1-2).

Проведено кластерний аналіз сортів за даними вмісту гірких речовин в шишках хмелю звичайного сортів української селекції (вміст α -, β - кислот та їх співвідношення), побудовано дендрограми (рис. 5.3 – за методом UPGMA, рис. 4.4 – за методом MCLM).

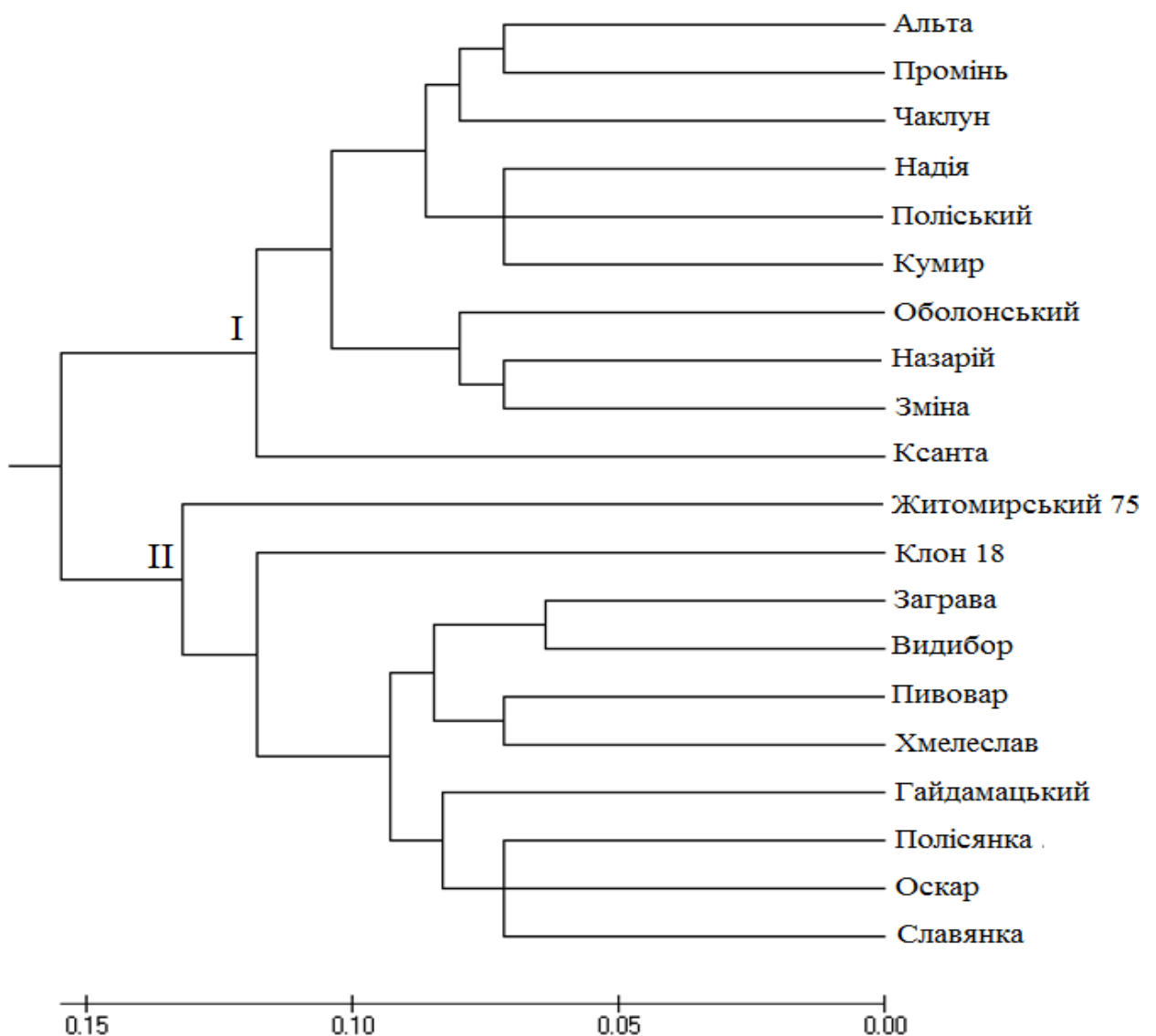


Рис. 5.3. Різноманіття сортів хмелю звичайного української селекції, основане на вмісті гірких речовин, визначене за методом UPGMA. I, II – кластери

За результатом аналізу, основанийого на вмісті гірких речовин, методом UPGMA відбувається чітка кластеризація сортів за їх типом. До кластеру I увійшли всі гіркі сорти, до кластеру II – всі ароматичні.

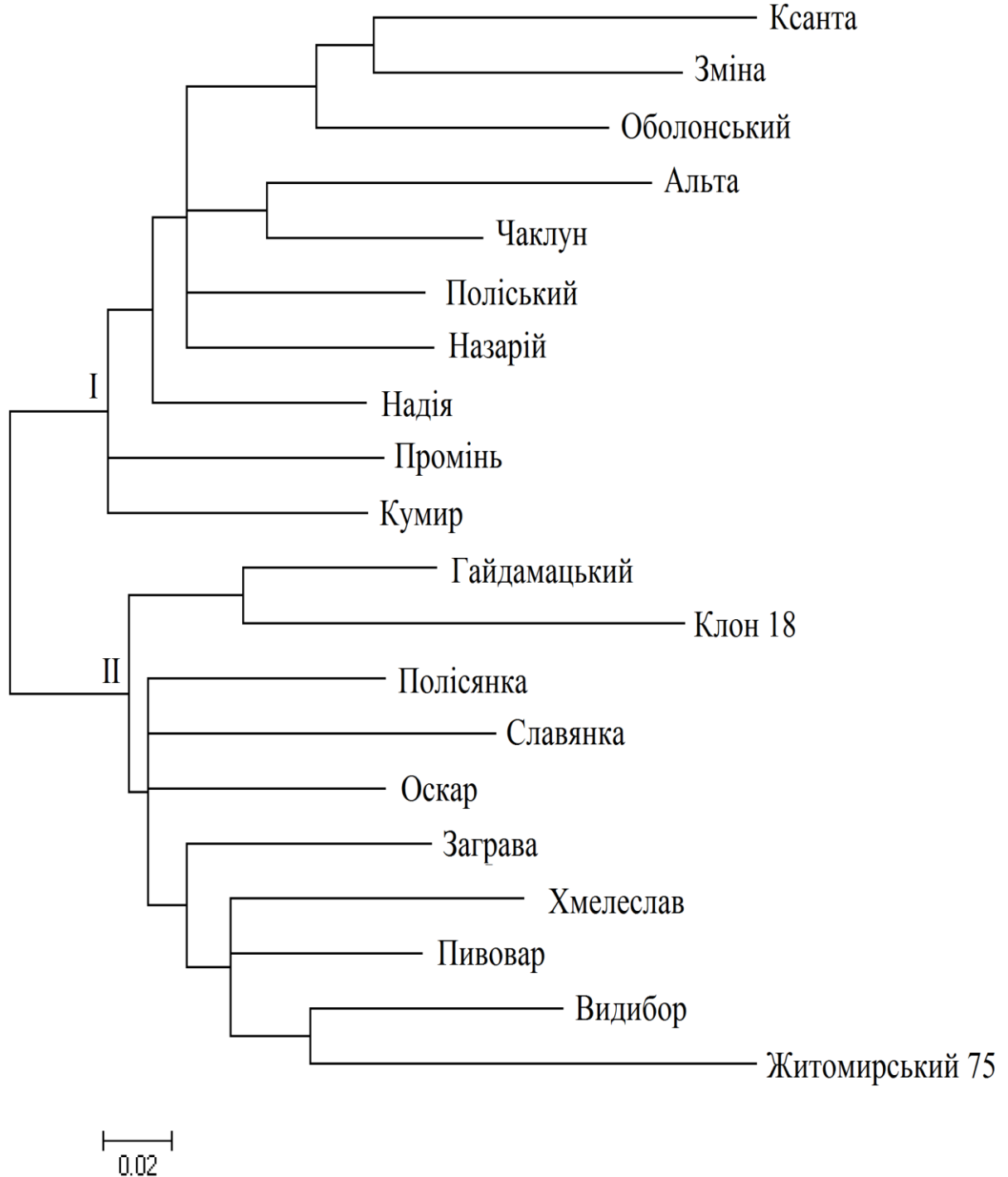


Рис. 5.4. Різноманіття сортів хмелю звичайного української селекції, основане на вмісті гірких речовин, визначене за методом MCLM. I і II – кластери

За результатом аналізу, основанийого на вмісті гірких речовин, методом MCLM, також відбувається чітка кластеризація сортів за їх типом. До кластеру I увійшли всі гіркі сорти, до кластеру II – всі ароматичні.

Метод UPGMA дозволяє побудувати дендрограми на основі наявності / відсутності алелів. Метод MCLM дозволяє побудувати дендрограми, виходячи із вирогідності знаходження кожного окремого показника в кожній конкретній позиції. За результатом аналізу поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, сорти хмелю звичайного утворюють два кластери. До одного входять гіркі сорти, до іншого – ароматичні.

За результатом аналізу, основанийого на поліморфізмі мікросателітних локусів та генів, що кодують халконсинтази побудовано дендрограми (рис. 5.5 – за методом UPGMA, рис. 5.6 – за методом MCLM).

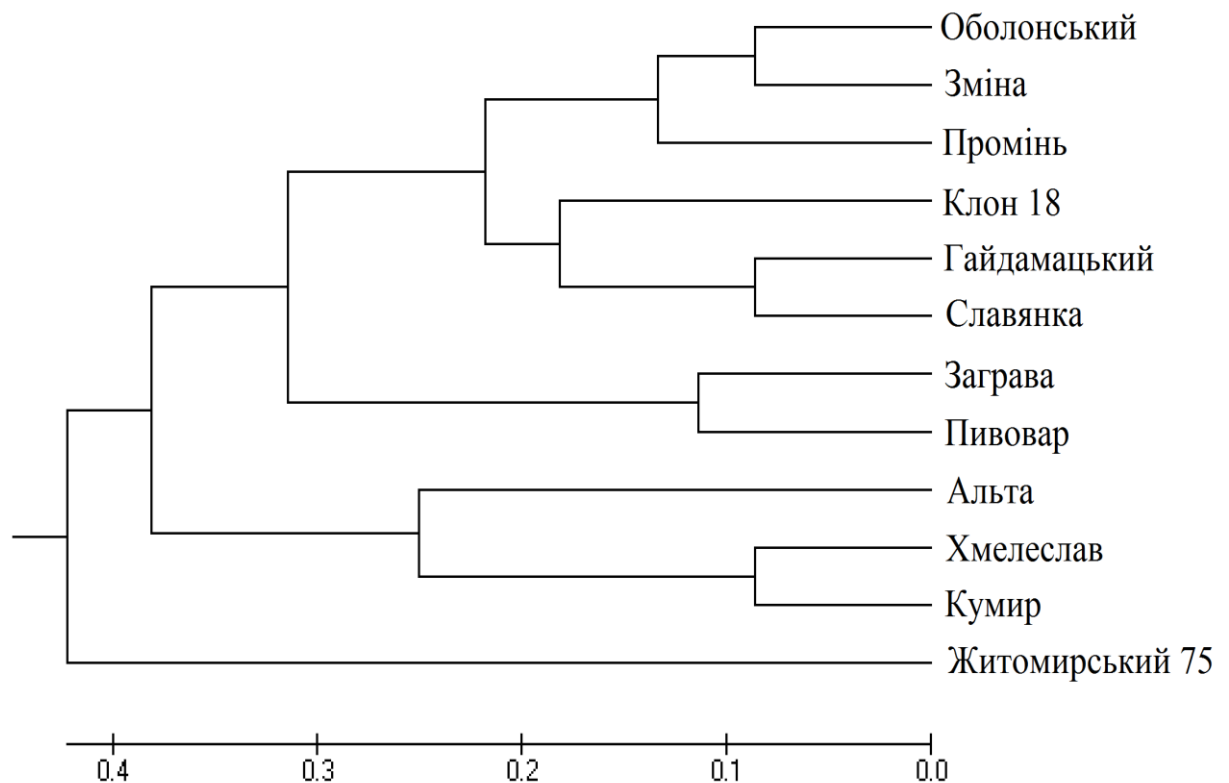


Рис 5.5. Різноманіття сортів хмелю звичайного української селекції, основане на поліморфізмі мікросателітних локусів за [10] та генів *chs*_{H1}, *chs*₂, *chs*₃, *chs*₄ і *vps* на основі кластерного аналізу за методом UPGMA

На дендрограмі, побудованій на поліморфізмі мікросателітних локусів та генів, що кодують халконсинтази, за методом MCLM, не відбувається розподілу сортів за типом.

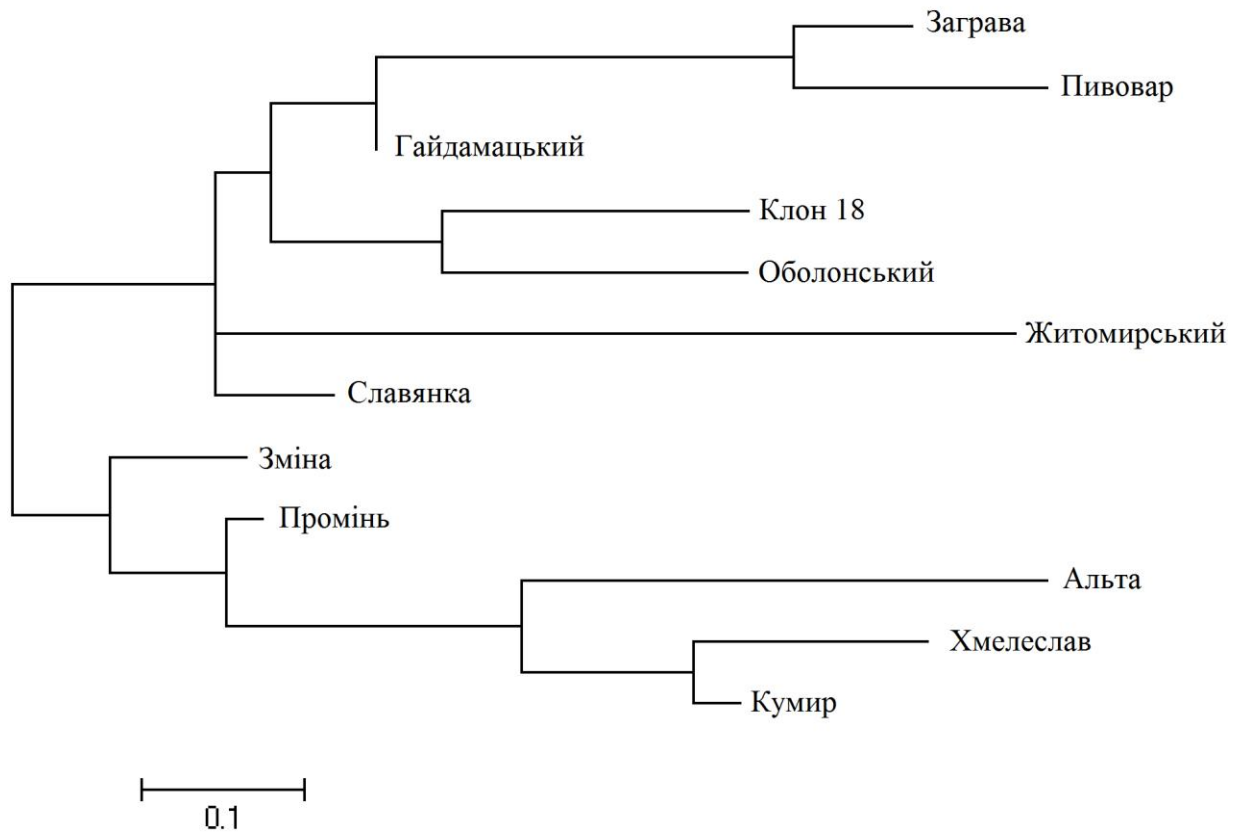


Рис 5.6. Різноманіття сортів хмелю звичайного української селекції, основане на поліморфізмі мікросателітних локусів за [10] та генів генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* і *vps* на основі кластерного аналізу за методом MCLM

Із наведених результатів показана можливість використання показника поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* для виявлення типу сорту, проте неможливість його використання для виявлення рівня гірких речовин, хоча частковий збіг і відбувався. Вірогідно, при використанні поліморфізму і інших виявлених поліморфних ділянок генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* можливе достовірне виявлення рівня гірких речовин у хмелю звичайного.

Достовірність зв'язку між поліморфізмом генів, що кодують халконсинтази, та рівнем гірких речовин в шишках хмелю звичайного обраховували за коефіцієнтом рангової кореляції Спірмана [109].

Коефіцієнт Спірмана $r = 0,881$.

Критична точка $T_{кр} = 0,190$.

$|r| > T_{кр}$ – нульова гіпотеза не підтверджується, ранговий кореляційний зв'язок між ознаками значущий.

Критична точка двосторонньої критичної області $t(\alpha, k) = 1,734$.

Довірчий інтервал $r = (0.79; 0.97)$.

Отже, зв'язок між ознакою «тип сорту» та поліморфізмом 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 генів та їх поєднань не призвів до угруповання сортів за типом на фоні повної диференціації сортів. Чітка кластеризація за типом здійснилась тільки при використанні сумарних даних щодо поліморфізму всіх досліджених генів. Це означає, що для синтезу певних кількостей когумулону, колупулону 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*.

Таким чином, 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 не є дорогою або довготривалою процедурою.

Результати розділу опубліковано у роботах:

1) Венгер А.М. Поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, та його зв'язок з рівнем гірких речовин шишок хмелю звичайного / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України – 2015. – № 2. – С. 1-9.

2) Венгер А.М. Молекулярні маркери у селекції хмелю звичайного / А. М. Венгер, Н.Е. Волкова // Матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції «Стан і перспективи формування сортових рослинних ресурсів в Україні». Київ, 11-13.07.2012 р. – С. 50-51.

3) Венгер А.М. Молекулярні маркери в реєстрації сортів хмелю звичайного / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Тези II Міжнародної науково-практичної конференції «Новітні досягнення біотехнології». – Київ, 24-25.10.2013 р. – С 30-31.

4) Венгер А.М. Ідентифікація типу сорту хмеля звичайного за молекулярними маркерами генів, що кодують халконсинтази / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». - 2014. - Т. 15. - С. 24-27.

5) Venger A. Genetic diversity of Ukrainian hop varieties and molecular markers in detection of aroma and bitter substances levels / A. Venger // Oral and poster presentation abstract volume of Global Genome Biodiversity Network, International Conference on biodiversity biobanking, London, Great Britain , 30.06.-02.07.2014. – P. 40-41.

РОЗДІЛ 6

ДОСЛІДЖЕННЯ СТАТІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Хміль звичайний – дводомна рослина, жіночі та чоловічі зразки якої мають різне значення у господарстві та промисловості. У господарстві використовують переважно жіночі рослини хмелю через наявність в їхніх шишках специфічних гірких речовин та їх похідних [64]. Чоловічі зразки використовуються переважно для схрещування при створенні нових сортів та гібридів.

При цьому виявити стать за зовнішніми ознаками можливо у зразка віком не менше 1,5 року [12]. Дослідження регіонів геному хмелю звичайного, пов'язаних із статтю, має задачу розробки способу виявлення статі хмелю на ранніх стадіях онтогенезу, що виключить накопичення баластних зразків у розсадництві.

Ефективність відомих з літератури статеспецифічних молекулярних маркерів має бути перевірена на кожній виборці зразків для виключення псевдорезультатів, тобто необхідно провести валідацію маркерів [83].

Як наведено в огляді літератури, для чоловічих зразків характерно наявність «чоловічоспецифічних» фрагментів 165 або 210 п.н. мікросателітного локусу *HLAGA7* (для європейської або азіатської та американської зародкової плазми, відповідно), тоді як у зразків жіночої статі ампліфікуються інші «нечоловічоспецифічні» фрагменти. Також на основі чоловічоспецифічного RAPD-фрагменту *OPJ9* розроблено STS-маркер, специфічний до Y-хромосоми. Результатом ПЛР-аналізу буде наявність / відсутність фрагмента ампліфікації розміром 1150 п. н. при тестуванні чоловічого / жіночого зразків, відповідно.

Нами проведено молекулярно-генетичне дослідження мікросателітного локусу *HLGA7* у вибірці чоловічих та жіночих зразків хмелю звичайного української селекції. Результати електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації відображені на рис 6.1.

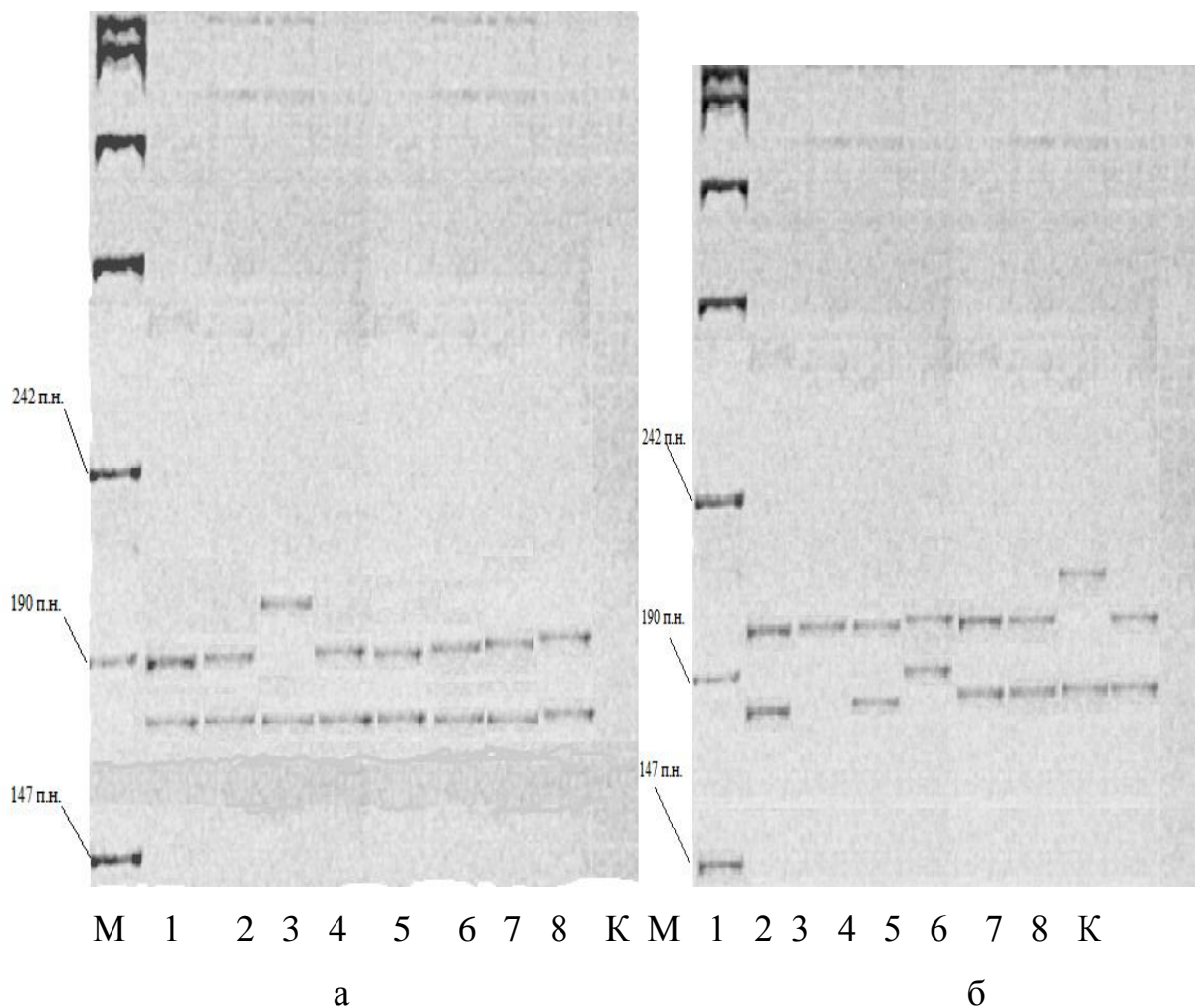


Рис. 6.1. Електрофоретичні профілі продуктів ампліфікації локусу *HLGA7* у зразків хмелю звичайного (а) чоловічої статі колекційних номерів 3з 65-6-1 (1), 2к 64-2-5 (2), 1к 64-1-1 (3), 2з 63-2-7 (4), 1з 63-2-3 (5), 5к 67-3-1 (6), 6к 67-4-8 (7), 4з 68-3-1 (8) та (б) жіночої статі сортів Надія (1), Оскар (2), Клон 18 (3), Оболонський (4), Хмелеслав (5), Кумир (6), Ксанта (7), Житомирський 75 (8). М – маркер молекулярної маси pUC19 DNA/MspI. К – негативний контроль (ПЛР-суміш без ДНК)

Результати ПЛР-аналізу чоловічих зразків та сортів узагальнено в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Поліморфізм мікросателітного локусу *HLGA7* хмелю звичайного у сортів та чоловічих зразків хмелю звичайного української селекції

Назва сорту	Розмір продукту ампліфікації, п.н.	Назва чоловічого зразка	Розмір продукту ампліфікації, п.н.
1	2	3	4
Альта	183, 207	3з 65-6-1	180, 189
Видибор	183, 207	2к 64-2-5	180, 189
Гайдамацький	207, 207, 207	1к 64-1-1	180, 213
Житомирський 75	183, 207	2з 63-2-7	180, 189
Заграва	183, 207	1з 63-2-3	180, 189
Зміна	207, 207	5к 67-3-1	180, 189
Ксанта	183, 225	6к 67-4-8	180, 189
Клон 18	183, 207	4з 68-3-1	180, 189
Кумир	183, 207		
Надія	183, 207		
Назарій	207, 207		
Промінь	183, 207		
Оболонський	189, 207		
Оскар	207, 207		
Пивовар	183, 207		
Полісянка	183, 207		

Продовження табл. 6.1

1	2	3	4
Поліський	183, 207		
Славянка	207, 207		
Хмелеслав	183, 207		
Чаклун	183, 207		

При дослідженні поліморфізму мікросателітного локусу *HLGA7* у зразків хмелю звичайного чоловічої статі виявлено три продукти ампліфікації розмірами 180, 189 та 213 п.н., тоді як у сортів хмелю звичайного української селекції - чотири продукти ампліфікації розмірами 183, 189, 207, 225 п.н. Всі виявлені фрагменти описані при дослідженні 183 зразків (37 європейських чоловічих, 38 європейських жіночих, 12 північноамериканських чоловічих, 78 північноамериканських жіночих, 16 японських невідомої статі, 1 японського чоловічого, 1 японського жіночого) [59].

За результатами досліджень серед 142 сортів хмелю звичайного різного походження встановлено 10 алелів локусу *HLGA7* розміром в діапазоні 173-232 п.н. [99]. При ПЛР-аналізі 174 генотипів хмелю звичайного різного еколого-географічного походження за локусом *HLGA7* встановлено 35 алелів розмірами 157-249 п.н. За результатами нашого дослідження встановлено шість алелів локусу *HLGA7*, розміри яких варіювали у діапазоні від 180 до 225 п.н.

Проаналізована можливість використання певних алелів мікросателітного локусу *HLGA7* як статеспецифічних маркерів, виходячи з даних літератури [59, 99]. Встановлено при аналізі розподілу алелів локусу *HLGA7* в групах зразків чоловічої та жіночої статі, що чоловічі зразки завжди є гетерозиготними: ампліфікуються чоловічоспецифічні алелі розміром 165 або 210 п.н. (для європейської або азіатської та американської

зародкової плазми, відповідно) та інший алель X-хромосоми. У зразків жіночої статі ампліфікуються один або два (гомозигота або гетерозигота) нечоловічоспецифічні алелі [59]. У нашому дослідженні не виявлено алелів розмірами 165 та 210 п.н. ані в зразках жіночої статі, ані в зразках чоловічої статі. Отримані нами результати не співпадають з очікуваними за літературними даними. Таким чином, розглядати алелі мікросателітного локусу *HLAGA7* як потенційні маркери статі неможливо.

Неможливість використання певних алелів мікросателітного локусу *HLAGA7* як маркерів статі призвела до необхідності пошуку іншого статеспецифічного маркера та його перевірки на вибірці зразків української селекції. За літературними даними, для визначення статі можливо використовувати маркер, розроблений для детекції регіону Y-хромосоми; результатом ПЛР-аналізу буде наявність / відсутність фрагмента ампліфікації при тестуванні чоловічого / жіночого зразків, відповідно. На основі чоловічоспецифічного RAPD-фрагменту *OPJ9* розроблено STS-маркер, специфічний до Y-хромосоми [100]. При ПЛР-аналізі за даним маркером в зразках чоловічої статі відбувається ампліфікація фрагмента розміром 1150 п.н., тоді як в зразках жіночої статі продукти ампліфікації відсутні. Цей маркер використали для оцінки 770 генотипів F_1 -потомства трьох схрещувань та успішно встановили стать у ювенальних рослин хмелю [100]. Даний маркер обрано нами для оцінки можливості його використання як статеспецифічного у вибірці зразків хмелю звичайного української селекції.

При ПЛР-аналізі 28 зразків хмелю звичайного за маркером STS продукт ампліфікації розміром 1150 п.н. отримано для всіх зразків чоловічої статі і не отримано для сортів (рис. 6.2). Слід зазначити, що відсутність продуктів ампліфікації у зразках жіночої статі не пов'язана з «неякісною» матричною ДНК, так як при мікросателітному аналізі даних сортів за локусом *HLAGA7* продукти ампліфікації отримано для всіх жіночих зразків, а

також в попередніх дослідженнях для даних сортів отримано молекулярно-генетичні паспорти [10]. Тобто виключено псевдонегативний результат щодо зразків жіночої статі.

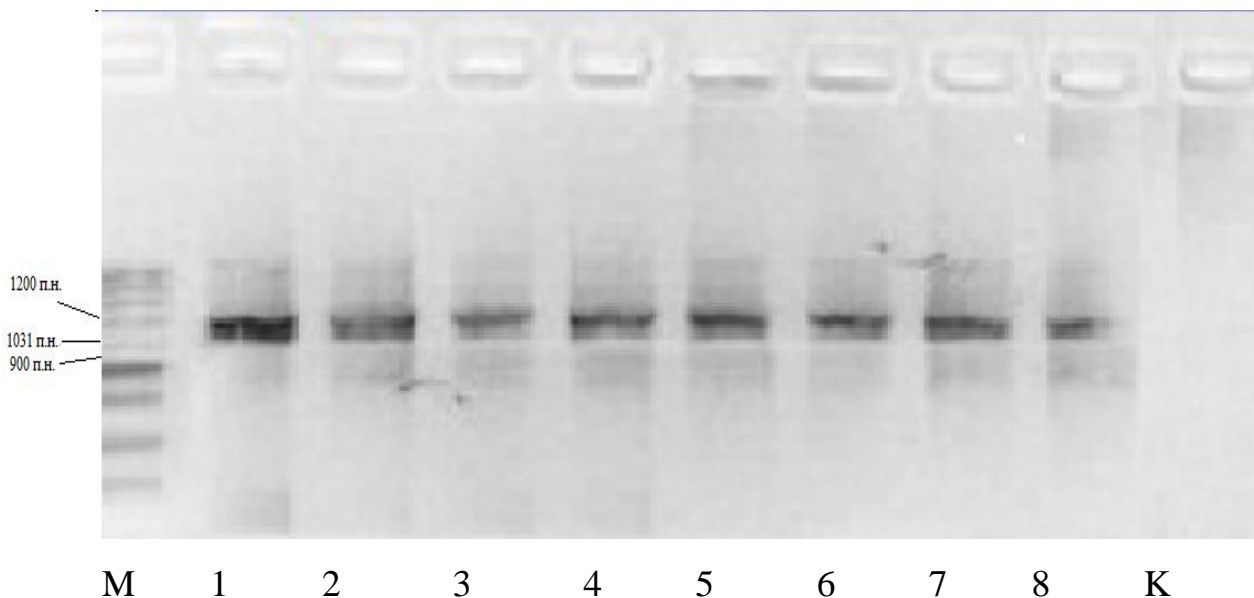


Рис. 6.2. Електрофоретичні профілі продуктів ампліфікації STS-локусу Y-хромосоми зразків хмелю звичайного чоловічої статі 3з 65-6-1 (1), 2к 64-2-5 (2), 1к 64-1-1 (3), 2з 63-2-7 (4), 1з 63-2-3 (5), 5к 67-3-1 (6), 6к 67-4-8 (7), 4з 68-3-1 (8). М – маркер молекулярної маси GeneRuler DNA Ladder mix. К – негативний контроль (ПЛР-суміш з водою замість ДНК)

Таким чином, на вибірці зразків хмелю української селекції підтверджено, що маркер STS дозволяє ідентифікувати стать. Позитивним моментом при використанні даного маркера є можливість розподілу продуктів ампліфікації у 2 %-агарозному гелі, що значно спрощує та скорочує процес визначення статі.

Процедура з використанням STS-маркера є швидкою і маловитратною, що має значення для експрес-діагностики великої кількості зразків. Перевагою методу також є добір для аналізу незначної кількості вихідного рослинного матеріалу, що дозволяє залишити рослину

життєздатною для подальшого дорощування добраних зразків хмелю звичайного.

Отже, за результатами дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму хмелю звичайного за мікросателітним локусом H1AGA7 використовувати його алелі як маркери статі неможливо внаслідок відсутності зв'язку наявності певного алеля (алелів) тільки у зразків певної статі. STS-маркер регіону Y-хромосоми є придатним для диференціації зразків хмелю звичайного за статтю. Але ми вважаємо також доцільним проведення молекулярно-генетичного аналізу мікросателітного локусу H1AGA7 для виключення псевдонегативних результатів дослідження.

Результати розділу опубліковано у роботах:

1) Венгер А.М. Визначення статі хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) за молекулярними маркерами / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту - Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення. – 2013. – Вип. 26 (61). - С. 161-166.

2) Венгер А. М. Оцінка генотипу хмелю звичайного за генами, що кодують халконсинтази, статтю та ураженістю бактеріальним раком / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова // Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур». – 2014. – С. 72.

3) Венгер А.М. Молекулярно-генетичні маркери у визначенні статі хмелю звичайного / А.М. Венгер, Н.Е. Волкова, Б.Ф. Кормільцев // Тези Міжнародної науково-практичної конференції «Перспективи розвитку рослинницької галузі в сучасних економічних умовах». – Скадовськ, 06-08.08.2013 р. – С. 5-6.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Отримання здорового садивного матеріалу хмелю звичайного у необхідній кількості за невеликий проміжок часу ефективно здійснюється при використанні методу клонального мікророзмноження *in vitro*. Для подальшого застосування садивного матеріалу важливим є його характеристика за рівнем цінних метаболітів та визначення статі. Сучасними підходами для вирішення цих питань є молекулярні біотехнології, зокрема на основі ПЛР-методу.

Нами для розробки молекулярно-біотехнологічних засад оцінки хмелю звичайного за типом сорту, статтю та ураженням *A. tumefaciens* проводили молекулярно-генетичне та біоінформатичне дослідження геному хмелю звичайного та *A. tumefaciens*. Результати досліджень підлягали математичному аналізу.

Проведений молекулярно-генетичний та біоінформатичний аналіз поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, на вибірці сортів хмелю звичайного української селекції та нуклеотидних послідовностях цих генів з бази даних GenBank NCBI для розробки біотехнологічних засад оцінки хмелю звичайного за типом сорту. Досліджено залежність між поліморфізмом генів, що кодують халконсинтази, та рівнем гірких речовин в сортах хмелю звичайного.

Поліморфізм мікросателітного локусу H1AGA7 на сортах і чоловічих зразках та STS-локусу статевої Y-хромосоми на чоловічих зразках хмелю звичайного української селекції досліджували для розробки біотехнологічних засад виявлення статі хмелю звичайного. Оцінено можливість використання маркерів даних локусів для виявлення статі хмелю звичайного.

Молекулярно-генетичний аналіз генів *virD2* та *ipt* Ті-плазміді проведений для розробки біотехнологічних засад детекції бактеріального раку. Запропонований двоетапний підхід для детекції бактеріального раку при аналізі тотальної ДНК, виділеної із тканин хмелю звичайного описаним методом.

Через відносно невелику кількість досліджень геному хмелю звичайного, зокрема відсутності даних щодо анотованої нуклеотидної послідовності усього геному, дослідження поліморфізму генів, що кодують халконсинтази (*chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*), є актуальним як для біології у цілому, так і для практичної біотехнології зокрема. У літературі існують дані щодо структур генів *chs_H1* та *vps* [96]. Показано, що вони складаються з промотору, екзону 1, інтрону, екзону 2 та 3'-НТР. Даних щодо генів *chs2*, *chs3* та *chs4* у літературі не наведено.

За результатами наших біоінформатичних досліджень виявлена структура та розмір генів *chs2*, *chs3* та *chs4*. Показано, що гени *chs2*, *chs3* складаються з екзону 1, інтрону та екзону 2, а ген *chs4* складається з промотору, екзону 1, інтрону, екзону 2 та 3'-НТР. Показані сайти праймування для використаних в роботі при дослідженні генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* праймерів.

При проведенні вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *chs_H1* встановлено поліморфізм в промоторі, екзонах, інтроні, 3'-кінцевому нетранслюємомі регіоні. Для промотору, інтрону та 3'-НТР встановлено поліморфізм як розміру, так і послідовності, який пов'язаний з однонуклеотидними замінами та інсерціями або делеціями (інделями). Показано, що екзони є поліморфними за рахунок однонуклеотидних замін.

За результатами вирівнювання генів *chs2* та *chs4* встановлено, що їх екзони є консервативними за розміром. Їх поліморфізм пов'язаний з однонуклеотидними замінами. Дослідити поліморфізм інших ділянок даних генів неможливо через відсутність у базі даних відповідних нуклеотидних

послідовностей.

За даним літератури, при аналізі поліморфізму гена *vps* шляхом вирівнювання 13 нуклеотидних послідовностей даного гена виявлені інделі в екзонах, а також дев'ять SNP у екзонах та інтроні [23]. При вирівнюванні 14 нуклеотидних послідовностей у нашій роботі виявлено як інделі, так і поліморфізм розміру в усіх ділянках гена.

В залежності від кількості ксантогумолу в складі α -кислот сорти хмелю звичайного поділяють на ароматичні (до 28 %) та гіркі (30 – 50 %) [12]. Визначення типу сорту за біохімічними маркерами є довготривалим та дорогим методом. Методи оцінювання рівня гірких кислот за молекулярними маркерами не описані. Тому необхідним було розроблення системи ідентифікації типу сортів хмелю звичайного за молекулярними маркерами генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*. Проаналізовано результати ПЛР з праймерами до поліморфних регіонів генів, що кодують халконсинтази хмелю звичайного. Виявлена асоціація поліморфізму даних регіонів з наявністю у зразка певного рівня гірких речовин, тобто типу сорту.

Таким чином, розроблена методика на основі молекулярних маркерів дозволяє ідентифікувати сорт хмелю звичайного за його типом. Дана методика є статистично достовірною, не потребує багато часу та дорогих реактивів, тому є актуальною.

Вивчення генетичних систем детермінації статі у рослин викликає інтерес з точки зору теоретичного розуміння феномену статі і є актуальним для селекційної практики. Одним з популярних рослинних об'єктів зі статевими хромосомами є хміль звичайний.

Для молекулярно-генетичного дослідження обрано мікросателітний локус *PIAGA7* для встановлення можливості використання певних алелів як маркерів статі хмелю звичайного, для чого проведено ПЛР-аналіз 28 зразків хмелю звичайного чоловічої та жіночої статі.

У літературі наведені дані щодо можливості використання певних алелів локусу *HLAGA7* як статеспецифічних маркерів [59]. Автори встановили при аналізі розподілу алелів локусу *HLAGA7* в групах зразків чоловічої та жіночої статі, що у зразків чоловічої статі ампліфікуються чоловічоспецифічні алелі розміром 165 п.н. або 210 п.н. (для європейської або азійської та американської зародкової плазми, відповідно) та інший алель X-хромосоми (чоловічі зразки завжди є гетерозиготними); у зразків жіночої статі ампліфікуються один або два (гомозигота або гетерозигота) нечоловічоспецифічні алелі. У нашому дослідженні не виявлено алелів розміром 165 та 210 п.н. ані в зразках жіночої статі, ані в зразках чоловічої статі. Отримані нами результати не співпадають з очікуваними за літературними даними. Таким чином, розглядати алелі локусу *HLAGA7* як потенційні маркери статі неможливо.

При ПЛР-аналізі зразків чоловічої статі встановлено три алеля локусу *HLAGA7* розміром 180, 189 та 213 п.н., причому сім зразків мали генотип 180-189 п.н. і один зразок – 180-213 п.н. Для вибірки зразків жіночої статі встановлено чотири алеля розміром в діапазоні 183-225 п.н.

За результатами досліджень серед 142 сортів хмелю звичайного різного походження встановлено 10 алелів локусу *HLAGA7* розміром в діапазоні 173-232 п.н. [100]. При ПЛР-аналізі 174 генотипів хмелю звичайного різного еколого-географічного походження за локусом встановлено 35 алелів розмірами 157-249 п.н. За результатами нашого дослідження встановлено шість алелів локусу *HLAGA7*, розміри яких варіювали у діапазоні від 180 до 225 п.н.

Неможливість використання певних алелів мікросателітного локусу *HLAGA7* як маркерів статі призвела до необхідності пошуку іншого статеспецифічного маркера та його перевірки на вибірці зразків української селекції. За літературними даними, для визначення статі можливо використовувати маркер, розроблений для детекції регіону Y-

хромосоми; результатом ПЛР-аналізу буде наявність / відсутність фрагмента ампліфікації при тестуванні чоловічого / жіночого зразків, відповідно. На основі чоловічоспецифічного RAPD-фрагменту OPJ9 розроблено STS-маркер, специфічний до Y-хромосоми. При ПЛР-аналізі за даним маркером в зразках чоловічої статі відбувається ампліфікація фрагмента розміром 1150 п.н., тоді як в зразках жіночої статі продукти ампліфікації відсутні. Цей маркер використовували для оцінки 770 генотипів F₁-потомства трьох схрещувань та успішно встановили стать у ювенальних рослин хмелю [99]. Даний маркер обрано нами для оцінки можливості його використання як статеспецифічного у вибірці зразків хмелю звичайного української селекції.

При ПЛР-аналізі 28 зразків хмелю звичайного за маркером STS продукт ампліфікації розміром 1150 п.н. отримано для всіх зразків чоловічої статі і не отримано для зразків жіночої статі. Слід зазначити, що відсутність продуктів ампліфікації у зразках жіночої статі не пов'язана з «неякісною» матричною ДНК, так як при мікросателітному аналізі даних сортів за локусом HAGA7 продукти ампліфікації отримано для всіх жіночих зразків, а також в попередніх дослідженнях для даних сортів отримано молекулярно-генетичні паспорти [10]. Тобто виключено псевдонегативний результат щодо зразків жіночої статі. Таким чином, на вибірці зразків хмелю української селекції підтверджено, що маркер STS дозволяє ідентифікувати стать.

Перевагою використання даного маркера є можливість розподілу продуктів ампліфікації у 2%-у агарозному гелі, що значно спрощує та скорочує процес визначення статі.

Процедура з використанням STS-маркера є швидкою і маловитратною, що має значення для експрес-діагностики великої кількості зразків. Перевагою методу також є добір для аналізу незначної

кількості вихідного рослинного матеріалу, що дозволяє залишити рослину життєздатною для подальшого дорощування дібраних зразків.

Впровадження молекулярних маркерів для визначення статі в програмі селекції хмелю, так званий добір за молекулярними маркерами, підвищить ефективність селекції і дозволить скоротити витрати праці, площ, часу.

Однак процедура виявлення статі у хмелю звичайного потребує перевірки жіночих зразків для виключення псевдонегативних результатів. Таким чином, за результатами дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму хмелю звичайного за мікросателітним локусом H1AGA7 використовувати його алелі як маркери статі неможливо внаслідок відсутності зв'язку наявності певного алеля (алелів) тільки у зразків певної статі. STS-маркер регіону Y-хромосоми є придатним для диференціації зразків хмелю звичайного за статтю.

Традиційно сорти хмелю ідентифікують за морфологічними, біохімічними та господарськими ознаками [7-9], прояв яких залежить від фази розвитку рослини та її віку, впливу екологічних та агрохімічних чинників. До недоліків традиційної ідентифікації хмелю можна віднести тривалість аналізу – від кількох місяців до декількох років.

Недостатня розпізнавальна здатність традиційних методів диференціації та ідентифікації сортів хмелю звичайного потребує розробки нових сучасних підходів, зокрема, на основі аналізу мінливості геному за допомогою молекулярних маркерів, що генеруються в процесі ПЛР [9].

За результатом кластерного аналізу поліморфізму мікросателітних локусів та генів, що кодують халконсинтази, побудовані дендрограми. У дендрограмі, побудованій за поліморфізмом мікросателітних локусів та генів, що кодують халконсинтази, за методом UPGMA, не відбувається розподілу сортів за типом.

Таким чином, за результатом кластерного аналізу використання поліморфізму всіх даних локусів є придатним лише для диференціації та паспортизації сортів. Використання поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, дозволяє не лише провести диференціацію та паспортизацію сортів, але й виявити тип сорту.

З літературних джерел відомо про використання для видової детекції *A. tumefaciens* ПЛР-аналізу консервативних ділянок генів *ipt* і *virD2* Ті-плазмиди. Ефективність цих маркерів показана на октопінових та нопалінових типах *A. tumefaciens*. Даних щодо ідентифікації агроцинопінових типів *A. tumefaciens* у літературі не наведено, що робило їх використання при виявленні бактеріального раку у рослин неповноцінним.

Оптимізовано систему детекції *A. tumefaciens*, що викликає бактеріальний рак рослин, зокрема хмелю звичайного, за допомогою молекулярних маркерів генів *virD2* та *ipt*. Дана система дозволяє виявити пухиноутворюючу Ті-плазмиду октопінового, нопалінового та агроцинопінового типів. Двоетапна перевірка наявності у тотальній ДНК Ті-плазмиди важлива для оцінювання ризику наявності *A. tumefaciens* у тканині хмелю. Так, при наявності у Ті-плазмиді онкогена *ipt*, але при відсутності регіону *virD2*, який відповідає за вірулентність, *A. tumefaciens* не здатен викликати бактеріальний рак рослин, тому за відсутності регіону *virD2* наявність *A. tumefaciens* є припустимою. Використання даного підходу дозволяє уникнути псевдопозитивних результатів при діагностиці бактеріального раку у рослин хмелю звичайного.

При розсадництві хмелю звичайного використовують зразки, вільні від *A. tumefaciens*. Шляхом добору та введення в культуру *in vitro* методом апікальних меристем отримано 197 зразків хмелю звичайного, вільних від *A. tumefaciens*. Дані зразки рекомендовано для подальших біотехнологічних, молекулярно-генетичних та селекційних досліджень.

Отже, результати біоінформатичних та молекулярно-генетичних досліджень дозволили розробити молекулярно-біотехнологічні засади оцінки хмелю звичайного за типом сорту, статтю та ураженням *A. tumefaciens*, що складаються з таких стадій.

1) Добір рослинного матеріалу. Матеріалом досліджень можуть слугувати будь-які тканини, частини, органи хмелю звичайного масою не менш 5 г. Зразок тричі промити деіонізованою водою та підсушити. Для ДНК-типуння підготувати 50-100 мг наважку. Решту зберігати при -20°C.

2) Виділення ДНК. Зразок тканини гомогенізувати. Виділення та очищення тотальної ДНК проводити за методикою [88]. Визначити кількість виділеної ДНК флуориметричним методом або гель-електрофорезом.

3) Постановка полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Провести ПЛР з праймерами до ділянок генів, що кодують халконсинтази, STS-праймерами до ділянки Y-хромосоми та праймерами до *ipt* та *virD2* генів Ті-плазмід. Послідовності праймерів та температурно-часові умови ПЛР наведено в табл. 2.4–2.5.

4) Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації. Провести електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР, негативних контролів та маркеру молекулярної маси pUC19 DNA/MspI (або аналог) у 10 % поліакриламідному (ПАА) (у випадку ПЛР з праймерами до генів, що кодують халконсинтази) або 2 % агарозному (у випадку ПЛР з праймерами до *ipt* і *virD2* генів Ті-плазмід та STS-праймерами до ділянки Y-хромосоми) гелях. Провести візуалізацію продуктів ампліфікації фарбуванням бромістим етидієм.

5) Визначення розмірів продуктів ампліфікації. Розміри продуктів ампліфікації у парах нуклеотидів (п.н.) визначити за допомогою програми аналізу гелів. При ПЛР з STS-праймерами до ділянки Y-хромосоми розмір продуктів ампліфікації складає 1150 п.н. або продукти ампліфікації відсутні.

Після ПЛР-аналізу з праймерами до *ipt* та *virD2* генів Ті-плазміді розміри продуктів ампліфікації становлять 427 п.н. та 224, 338, 661 п.н., відповідно.

6) Кластерний аналіз. Провести за допомогою програми TREES 4.0 кластерний аналіз даних щодо поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *ups* разом з даними, попередньо отриманими нами для 20 сортів української селекції, за алгоритмом Clustal W та побудувати дендрограми за методом UPGMA.

7) Опрацювання результатів. При визначенні типу сорту: після кластерного аналізу зразок буде розташований в одному з двох кластерів: в кластері з ароматичними або гіркими сортами.

При визначенні статі: зразок вважається чоловічої статі, якщо після ПЛР з праймерами до ділянки Y-хромосоми є продукти ампліфікації розміром 1150 п.н. При відсутності продуктів ампліфікації з даними праймерами зразок вважається жіночої статі.

При детекції патогенних *A. tumefaciens*: зразок вважається хворим на бактеріальний рак рослин за наявності продуктів ампліфікації з праймерами до *ipt* і *virD2* генів Ті-плазміді розмірами 427 п.н. та 224, 338, 661 п.н., відповідно. При відсутності продуктів ампліфікації з однією або двома парами праймерів зразок вважається здоровим.

Примітки. В залежності від задач дослідника можливо проводити як комплексну оцінку зразка, так і визначення окремих показників. У випадку визначення тільки статі аналізувати спочатку мікросателітний локус H1AGA7 для встановлення реакційної здатності виділеної ДНК, а потім – ділянку Y-хромосоми з STS-маркерами.

Після визначення даних характеристик зразки хмелю звичайного є придатними для введення в культуру *in vitro*.

Приклад дослідження зразка хмелю звичайного за типом сорту, статтю та ураженням *A. tumefaciens* наведено на рис. 7.1.

Результати аналізу зразка X хмелю звичайного

Напряму аналізу	Етап											Висновок	
	Виділення ДНК, ПЛР-аналіз ділянок генів/локусів, гель-електрофорез, встановлення розмірів продуктів ампліфікації										Кластерний аналіз		
Визначення типу сорту	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		Тип сорту - гіркий
	255, 267	248, 264	218, 218	580, 580	230, 230	232, 232	217, 217	188, 188	917, 1303	211, 211	402, 402		
Визначення статі	12					13					-	Стать - чоловіча	
	1150, 1150					189, 207					-		
Встановлення ураження агробактеріями	14					15					-	Наявність збудника бактеріального раку	
	427, 427					224, 338					-		

Примітка. *Розміри (п.н.) фрагментів ПЛР-ампліфікації ділянок генів/локусів: 1 - 3'-нетрансльований регіон, 2, 3 - інтрон, 4 - екзон 2 гена *chs_H1*, 5 - інтрон гена *chs2*, 6 - ген *chs3*, 7 - ген *chs4*, 8 - промотор, 9 - регіон «екзон 1, інтрон, екзон 2», 10 - інтрон, 11 - екзон2 гена *vps*; 12 - STS-локус Y-хромосоми; 13 - HLAGA7; 14 - *ipt*, 15 - *virD2*

Рис. 7.1. Схема оцінки хмелю звичайного за типом сорту, статтю та ураженням *A. tumefaciens*.

ВИСНОВКИ

Теоретично та експериментально проаналізовано молекулярно-генетичний поліморфізм регіонів ядерного геному хмелю звичайного, пов'язаних з синтезом цінних вторинних метаболітів та проявом статі, досліджено ділянки Tі-плазмід збудника бактеріального раку *A. tumefaciens*, протестовано та добрано зразки, вільні від *A. tumefaciens*, проведено їхнє клональне мікророзмноження та розроблено молекулярно-біотехнологічні засади комплексної оцінки зразка хмелю за типом сорту, статтю та наявністю ураження бактеріальним раком.

1. За результатами біоінформатичних та молекулярно-генетичних досліджень Tі-плазмід *A. tumefaciens* визначено, що за наявності регіону *virD2*, який відповідає за вірулентність, але за відсутності гена патогенності *ipt*, *A. tumefaciens* не здатний викликати бактеріальний рак, тому за відсутності в Tі-плазміді гена *ipt* наявність *A. tumefaciens* є припустимою.

2. Шляхом добору за молекулярними маркерами Tі-плазмід та введення в культуру *in vitro* методом апікальних меристем отримано 197 зразків хмелю звичайного, вільних від *A. tumefaciens*. Дані зразки рекомендовано для подальших біотехнологічних, молекулярно-генетичних та селекційних досліджень.

3. За даними біоінформатичних досліджень генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, що кодують халконсинтази, встановлено поліморфізм різних регіонів (екзонів, інтронів, 3'-нетрансльованих регіонів), а саме інсерції, делеції, однонуклеотидні заміни. Здійснено анотацію генів *chs2*, *chs3* та *chs4*: показано наявність у кожного двох екзонів та інтрону, визначено їх розміри.

4. На основі результатів молекулярно-генетичних досліджень генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, що кодують халконсинтази, визначено поліморфізм різних регіонів. За рівнем та типами поліморфізму сорти української селекції значно відрізнялися від сортів з інших еколого-

географічних груп (північноамериканської та європейської зародкових плазм), що пов'язано, можливо, з використанням при селекції даних сортів специфічних зразків, зокрема чоловічих форм складного селекційного походження та місцевих дикорослих зразків.

5. Встановлено статистично достовірний зв'язок між сумарним поліморфізмом різних регіонів генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps*, що кодують халконсинтази, та показником «тип сорту» (ароматичний або гіркий), тобто вмістом і співвідношенням когумулону та колупулону.

6. Для визначення статі хмелю на ранніх стадіях онтогенезу необхідною є двокрокова процедура: аналіз мікросателітного локусу H1AGA7 для виключення псевдонегативного результату та тестування STS-локусу Y-хромосоми для виявлення чоловічої статі.

7. Генетичні ідентифікаційні формули сортів хмелю звичайного української селекції, в яких відображено алельний склад мікросателітних локусів, доповнено даними щодо генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps*, що кодують халконсинтази.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Розроблено молекулярно-біотехнологічні засади комплексної оцінки зразка хмелю звичайного щодо типу сорту (гіркий / ароматичний), статі та ураження *A. tumefaciens*. Рекомендуємо:

1. Використання даних щодо поліморфізму різних ділянок генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps*, що кодують халконсинтази, для визначення типу сорту хмелю звичайного.

2. Використання молекулярного маркеру STS для визначення статі хмелю звичайного.

3. Використання молекулярних маркерів обох генів *ipt* та *virD2* для визначення наявності бактеріального раку у хмелю звичайного.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Жигало Ю.В. До методики ідентифікації сортів хмелю (*Humulus lupulus* L.) за морфологічними ознаками / Ю.В. Жигало // Хмелярство. – 2005. – Вип. 22. – С. 17–25.
2. Кормільцев Б.Ф. Вплив складу середовища на регенерацію різних сортів хмелю у культурі *in vitro* / Б.Ф. Кормільцев, Т.І. Козлик, О.В. Черненкота ін. // Агропромислове виробництво Полісся. — 2012. — Вип. 5. — С. 61–64.
3. Кормільцев Б.Ф. Використання біотехнологічних методів при розмноженні вихідного селекційного матеріалу хмелю / Б.Ф. Кормільцев, І.П. Штанько, К.П. Михайліченко та ін. // Агропромислове виробництво Полісся. – 2014. – Вип. 7. – С. 73-76.
4. Мельничук Д. Біотехнологічні аспекти прогнозування якості садивного матеріалу (на прикладі *Humulus lupulus* L.) / Мельничук М. Д., Оверченко В. В., Ключаденко А. А. та ін. // Насінництво: теорія і практика прогнозування продуктивності сортів і гібридів за якістю насіння та садивного матеріалу: наукові праці Південного філіалу НУБіПУ "Кримський агротехнологічний університет" . 2009. Вип. 127, Сільськогосподарські науки. С. 21-29
5. Мельничук М. Вплив вірусної інфекції на цито-гістологічний та функціональний стан хмелю (*Humulus*) / М. Мельничук, А. Ліханов, І. Григорюк та ін. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2012. – Вип. 62. – С. 64-67.
6. . Мельничук М.Д. Генетичне різноманіття сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) української селекції / М.Д. Мельничук, В.В. Оверченко, В.Г. Спиридонов та ін. // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. – 2008. – Вип. 11. – С. 152-155.

7. Методичні рекомендації щодо ведення розсадництва хмелю // Наказ Міністерства аграрної політики України та Української академії аграрних наук / N 689/119. – 2008. – 16 с.
8. Методика проведення експертизи сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) на відмінність, однорідність і стабільність // УПОВ ТГ /227/1. - 2006. – 13 с.
9. Оверченко В.І. Спосіб ідентифікації генотипів хмелю // Патент на корисну модель. – 2009. – Бюл. № 20. – 6 с.
10. Сиволап Ю.М. Оцінка генетичного різноманіття хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) / Сиволап Ю.М., Захарова О.О., Кожухова Н.Е. та ін. // Цитология и генетика. - 2010. - № 5. – С. 3-15.
11. Штанько І.П. Каталог сортів хмелю, дозволених для поширення в Україні / І.П. Штанько, В.В. Шабликін, К.П. Михайліченко та ін. // Житомир: ККГВ «Полісся». 2010. – С. 68.
12. Ляшенко Н.И., Михайлов Н. Г., Рудык Р. И. Физиология и биохимия хмеля // Житомир “Полісся” - 2004. - С. 90 – 210.
13. Abe I. Benzalacetone synthase. A novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum* / I.Abe, Y.Takahashi, H. Morita et al. // Eur. J. Biochem. - 2001. - Vol. 268. - P. 3354-3359.
14. Arczewska M. The molecular organization of prenylated flavonoid xanthohumol in DPPC multibilayers: X-ray diffraction and FTIR spectroscopic studies / M. Arczewska, D.M. Kamiński, E. Górecka et al. // Biochim. Biophys. Acta–Biomembr. – 2013. – Vol. 18. – P. 213-222.
15. Arimoto-Kobayashi S. Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens / S. Arimoto-Kobayashi, C. Sugiyama, N. Harada et al. // J. Agric. Food Chem. - 1999. – Vol. 47. - P. 221–230.

16. Austin M.B. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases / M.B. Austin, J.P. Noel // Nat. Prod. Rep. – 2003. – Vol. 20. – P. 79.
17. Bassil N. Genic SSRs for European and North American hop (*Humulus lupulus* L.) / N. Bassil, B. Gilmore, J. Oliphant et al. // Genet. Resour. Crop Evol. – 2008. – Vol. 55 (7). – P. 959-969.
18. Biendl M. Studies on the production of a xanthohumol-enriched hops product / M. Biendl, R. Eggers, N. Czerwonatis et al. // Cerveza y Malta. - 2001. – Vol. 38. – P. 25–29.
19. Binder S. Branched-chain amino acid metabolism in higher plants / S. Binder, T. Knill, J. Schuster // Physiol. Plant. – 2007. – Vol. 129. – P. 68-78.
20. Bolca S. Disposition of hop prenylflavonoids in human breast tissue / S. Bolca, J. Li, D. Nikolic, N. Roche et al. // Mol. Nutr. Food. Res. – 2010. – Vol. 52, № 2. – P.284–294.
21. Buchter C. Isoxanthohumol, a constituent of hop (*Humulus lupulus* L.), increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans* dependent on the transcription factor DAF-16 / C. Buchter, S. Havermann, K. Koch et al. // Eur. J. Nutr. - 2015. – Vol. 1. – P. 15-12.
22. Buck E.J. Validation of new sex specific DNA markers for hops (*Humulus lupulus* L.) / E.J. Buck, C. Wiedow, C. Carlisle et al. // Acta. Hortic. -2009. –Vol. 848. – P. 323–328.
23. Castro C. DNA sequence and expression variation of hop (*Humulus lupulus*) valerophenone synthase (VPS), a key gene in bitter acid biosynthesis / C. Castro, L. Whittock, S. Whittock et al. // Ann. Bot. – 2008. – Vol. 102 (2). – P. 265–273.
24. Cerenak A. Identification of QTLs for alpha acid content and yield in hop (*Humulus lupulus* L.) / A. Cerenak, Z. Satovic, J. Jakse et al. // Euphytica. – 2009. – Vol. 170. – P. 141-154.

25. Chadwick L. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties / L.R.Chadwick, G. F. Paul, N. R. Farnsworth // *Phytomedicine*. - 2006. – Vol. 13. – P. 119–131.
26. Chae, L. Genomic signatures of specialized metabolism in plants / L. Chae, T. Kim, R. Nilo-Poyanco et al. // *Science*. – Vol. 344. – P. 510-513.
27. Cleemput M. Hop (*Humulus lupulus*) – derived bitter acids as multipotent bioactive compounds / M. Cleemput, K. Cleemput, K. De Bosscher et al. // *J. Nat. Prod.* – 2009. – Vol. 72 (6). – P. 1220–1230.
28. Ceh B. Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar / B. Ceh, M. Kac, I.J. Kosir et al. // *J. Mol. Sci.* – 2007. – Vol. 8. – P. 989–1000.
29. Cleemput M.V. Hop bitter acids efficiently block inflammation independent of GR α , PPAR β , or PPAR γ / M.V. Cleemput, A. Heyerick, C. Libert et al. // *Mol. Nutr. Food. Res.* - 2009. – Vol. 53. – P. 1143-1155.
30. Clark S. Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*) / S. Clark, V. Vaitheeswaran, S. Ambrose et al. // *BMC Plant biol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 24-28.
31. de Cooman L. Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties / L. de Cooman, E. Everaert, D. de Keukeleire // *Phytochem. Anal.* – 1998. – Vol. 9. – P. 145–150.
32. Danilova T.V. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.) / T.V. Danilova, G.I. Karlov // *Euphytica*. – 2006. – Vol. 151. – P. 15-21.
33. Delmulle L. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines / L. Delmulle, A. Bellahcene, W. Dhooge et al. // *Phytomedicine*. – 2006. – Vol. 13. – P. 732–734.

34. Divashuk M.G. Molecular cytogenetic mapping of *Humulus lupulus* sex chromosomes / M.G. Divashuk, O.S. Olexandrov, P.Y. Kroupin et al. // Cytogenetic Genome Res. – 2011. – Vol. 134 – P. 213-219.
35. Dorn C. Xanthohumol, a chalcon derived from hops, inhibits hepatic inflammation and fibrosis / C. Dorn, B. Kraus, M. Motyl et al. // Mol. Nutr. Food. Res. – 2010. – Vol. 54. – P. 205–213.
36. Dresel M. Sensomics analysis of key bitter compounds in the hard resin of hops (*Humulus lupulus* L.) and their contribution to the bitter profile of pilsner-type beer / M. Dresel, A. Dunkel, T. Hofmann // J. Agric. Food. Chem. – 2015. – Vol. 63. – P. 3402-3418.
37. Du H. Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis / H. Du, Y. Huang, Y. Tang // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 86. – P. 1293–1312.
38. Durbin M.L. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome / M.L. Durbin, B. McCaig, M.T. Clegg // Plant. Mol. Bio. – 2000. – Vol. 42 (1). – P. 79-92.
39. Eckermann C. Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins / C. Eckermann, G. Schröder, S. Eckermann et al. // Phytochemistry – 2003. – Vol. 62 (3). – P. 271–286.
40. Ellis J.G. Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids-the role of agrocinosines / J.G. Ellis, A. Kerr, A. Petit et al. // Mol. Gen. Genet. – 1982. – Vol. 186. – P. 269–274.
41. Erkkola R. A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts / R. Erkkola, S. Vervarcke, S. Vansteelandt et al. // Phytomedicine. – 2010. – Vol. 17, № 6. – P. 389–396.
42. Etteldorf N. New chalcones from hop, *Humulus lupulus* L. / N. Etteldorf, N. Etteldorf, H. Becker // Z. Naturforsch. - 1999. - Vol. 54. – P. 610–612.

43. Farago J. The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus*) improvement / J. Farago, I. Psenakova, N. Faragova / Nova biotechnological. – 2009. – Vol. 3 (9). – P. 279-293.
44. Ferrer J. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polycetide biosynthesis / J. Ferrer, J.M. Jez, M.E. Bowman et al. // Nat. Struct. Biol. – 1999. – Vol. 6. – P. 24-36.
45. Flores-Sanchez J. Plant polyketide synthases: a fascinating group of enzymes / J. Flores-Sanchez, R. Verpoorte // Plant Physiol. Biochem. – 2009. – Vol. 47 (3). – P. 167-174.
46. Fussy Z. Imbalance in expression of hop (*Humulus lupulus*) chalcone synthase H1 and its regulators during hop stunt viroid pathogenesis / Z. Fussy, J. Patzak, J. Stehlik, J. Matousek // J. Plant. Physiol. – 2013. - Vol. 70, № 7. – P. 688-695.
47. Gagne S.J. A cannabinoid pathway cyclase enzyme reveals a new catalytic route to plant polyketides / Gagne S.J., Stout J.M., Liu E., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – Vol. 109. – P. 12811-12816.
48. Gatica-Arias A. Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L. / A. Gatica-Arias, M. Stanke, U. Born et al. // Plant Cell Rep. – 2012. – Vol. 31, № 1. – P. 111–119.
49. Gelvin S. B. Traversing the cell: *Rhizobium* T-DNA's journey to the host genome / S. B. Gelvin // Front. Plant. Sci. – 2012. – Vol. 3. – P. 52.
50. Gram H.C. Uber die isolierte Färbung der Schizomycetenin Schnitt- und Trockenpreparaten / H.C. Gram // Fortschritte der Medizin. – 1884. – Vol. 2. – P. 185-89.
51. Guo M. *Rhizobium* VirD2-binding protein is involved in tumorigenesis and redundantly encoded in conjugative transfer gene clusters / M. Guo, Q. Hou, C. Hew et al. // Mol. Plant. Microbe. – 2007. – Vol. 20. – P. 1201–1212.

52. Haensel R. Desmethylxanthohumol: isolation and cyclization to flavanones / R. Haensel, J. Schulz // *Arch. Pharm.* – 1988. – Vol. 321. – P. 37–40.
53. Haas J.M. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Rhizobium* strains / J.M. Haas, L.W. Moore, W. Ream et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – P. 2879–2884.
54. Hayatsu H. Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens / H. Hayatsu // *J. Agric. Food Chem.* - 1999. – Vol. 47. - P. 221–230.
55. Henkel C.V. Genome sequence of the octopine-type *Rhizobium radiobacter* strain Ach5 / C.V. Henkel, A. Dulk-Ras, X. Zhang et al. // *Genome Announc.* – 2014. – Vol. 2. – P. 225-239.
56. Henning J.A. Genetic diversity among world hop accessions grown in the USA / J.A. Henning, J.J. Steiner, K.E. Hummer // *Crop. Sci.* – 2004. – Vol. 44. – P. 411–417.
57. Henning J. QTL mapping of powdery mildew susceptibility in hop (*Humulus lupulus* L.) / J. Henning, M. Townsend, D. Gent et al. // *Euphytica.* – 2011. – Vol. 180. – P. 411-420.
58. Howard E. High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DArT) / E. Howard, S. Whittock, J. Jakše et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2011. – Vol. 122. – P. 1265-1280.
59. Jakše J. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.) / J. Jakše, Z. Satovic, B. Javornik // *Genome.* – 2004. – Vol. 47. – P. 889–899.
60. Jez J. Structure and mechanism of chalcone synthase-like polyketide synthases / J. Jez, J. Ferrer, M. Bowman, M. Austin et al. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 27. – P. 393-398.
61. Jirasko R. Identification of new phase II metabolites of xanthohumol in rat in vivo biotransformation of hop extracts using high-performance liquid

- chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry / R. Jirasko, M. Holcapek, E. Vrublova et al. // *J. Chromatogr.* – 2010. – Vol. 12. – P. 4100-4108.
62. Junhua Z. Discrimination of tsingtaodahua from other hop cultivars and its quality control by molecular analyses / Z. Junhua, Y. Lin, Y. Gu et al. // *J. Inst. Brew.* – 2005. – Vol. 111(2). – P. 229–233.
63. Kavalier A. Phytochemical and morphological characterization of hop (*Humulus lupulus* L.) cones over five developmental stages using high performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, ultrahigh performance liquid chromatography photodiode / A. Kavalier, A. Litt, C. Ma et al. // *J. Agric. Food. Chem.* – 2011. – Vol. 59. – P. 4783–4793.
64. de Keukeleire J. Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.) / J. de Keukeleire, G. Ooms, A. Heyerick et al. // *J. Agric. Food. Chem.* – 2003. – Vol. 51. - P. 4436–4441.
65. Koie K. Construction of the genetic linkage map and QTL analysis on hop (*Humulus lupulus* L.) / K. Koie // *Acta. Hortic.* – 2005. – Vol. 668. – P. 59-66.
66. Lacroix B. Association of the *Rhizobium* T-DNA-protein complex with plant nucleosomes / B. Lacroix, A. Loyter, V. Citovsky // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105. – P. 15429–15434.
67. Liu M. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*) / M. Liu, P. Hansen, G. Wang et al. // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20. – P. 754-779.
68. Loake G. L. Combination of H-box [CCTACC(N)₇CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate

- p-coumaric acid / G. L. Loake, O. Faktor, C. J. Lamb et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89 (19). – P. 9230-9234.
69. Matousek J. Combinatorial analysis of lupulin gland transcription factors from R2R3Myb, bHLH and WDR families indicates a complex regulation of *chs_H1* genes essential for prenylflavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.) / J. Matousek, T. Kosabek, J. Patzak et al. // Plant. Biol. – 2012. – Vol. 12. – P. 12-27.
70. Matousek J. Cloning and characterisation of *chs*-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.) / J. Matousek, P. Novak, J. Briza et al. // Plant Science. – 2002. – Vol. 162. – P. 1007-1018.
71. Matousek J. Sequence analysis of a “true” chalconesynthase (*chs_H1*) oligofamily from hop (*Humulus lupulus* L.) and PAP1-activation of *chs_H1* in heterologous systems / J. Matousek, L. Vrba, J. Skopek et al. // J. Agric. Food. Chem. – 2006. – Vol. 54. – P. 7606–7615.
72. Matousek J. Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of medicines hops / J. Matousek, P. Novak, J. Patzak et al. // Rostlinnavyroba. – 2002. - Vol. 48 (1). – P. 7-14.
73. McAdam E. Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry / E. McAdam, J.S. Freeman, S. Whittcock et al. // BMC Genetics. – 2013. – Vol 14. – P. 14-36.
74. McAdam E. Quantitative genetic parameters for yield, plant growth and cone chemical traits in hop (*Humulus lupulus* L.) / E. McAdam, R.E. Vaillancourt, A. Koutoulis et al. // BMC Genetics. – 2014. – Vol. 15. – P. 15-22.
75. McCaskill D. Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants / D. McCaskill, R. Croteau // Nat. Biotechnol. - 1999. - Vol. 17. - P. 31–36.

76. Michael B. The chalconesynthase superfamily of type III polyketidesynthases / B. Michael, A.P. Noel, J.P. Noel // *Nat. Prod. Rep.* – 2003. – Vol. 20. – P. 79–110.
77. Miranda C.L. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines / C.L. Miranda, J.F. Stevens, H.Helmrich et al. // *Food. Chem. Toxicol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 271–285.
78. Mizobuchi S. New flavanone with antifungal activity isolated from hops / S. Mizobuchi, Y.A. Sato // *Agric. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 48. – P. 2771–2775.
79. Murakami A. Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L. / A. Murakami, P. Darby, B. Javornik et al. // *Genet. Resour. Crop. Evol.* – 2006. – Vol. 53. – P. 1553–1562.
80. Murakami A. Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus* L. / A. Murakami, P. Darby, B. Javornik et al. // *Heredity.* – 2006. – Vol. 97. – P. 66–74.
81. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15(3). – P. 473–497.
82. Nagel J. EST Analysis of hop glandular trichomes identifies an-O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol / J. Nagel, L.K. Culley, Y. Lu et al. // *Plant Cell.* – 2008. – Vol. 20. – P. 186–200.
83. Natsume S. The draft genome of hop (*Humulus lupulus*), an essence for brewing / S. Natsume, H. Takagi, A. Shiraishi et al. // *Plant Cell Physiol.* – 2014. – Vol. 56. – P. 428–441.
84. Nookandeh A. Xanthohumol metabolites in faeces of rats / A. Nookandeh, N. Frank, F. Steiner et al. // *Phytochemistry.* – 2004. – Vol. 65. – P. 561–570.

85. Novak P. Chalcone synthase homologues from *Humulus lupulus*: some enzymatic properties and expression / P. Novak, K. Krofta, J. Matousek // *Biologiaplantarum*. – 2006. – Vol. 50 (1). – P. 48-54.
86. Novak P. Valerophenone synthase-like chalcone synthase homologues in *Humulu slupulus* / P. Novak, J. Matousek, J. Briza // *Biol. Plant.* - 2003. – Vol. 46. – P. 375–381.
87. Okada Y. Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.) / Y. Okada, K. Ito // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2001. – Vol. 65. – P. 150–155.
88. Okada Y. Enzymatic reactions by five chalcone synthase homologs from hop (*Humulus lupulus* L.) / Y. Okada, Y. Sano, T. Kaneko et al. // *Biosci. Biotrchnol. Biochem.* – 2004. – Vol. 68 (5). – P. 1142-1145.
89. Okada Y. Molecular cloning and expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene responsible for essential oil biosynthesis in hop (*Humulus lupulus*) / Y. Okada, M. Sugimoto, I. Kazutoshi // *J. Plant. Physiol.* – 2001. – Vol. 158 (9). – P. 1183–1188.
90. Okada Y. Bifunctional activities of valerophenone synthase in hop (*Humulus lupulus* L.) / Y. Okada, Y. Yamazaki, D.Y. Suh et al. // *J. Am. Soc. Brew. Chem.* – 2001. – Vol. 59. - P. 163–166.
91. Ozeki Y. Purification and some properties of chalcone synthase from a carrot suspension culture induced for anthocyanin synthesis and preparation of its specific antiserum / Y. Ozeki, K. Sakano, A. Komamine et al. // *J. Biochem.* – 1985. – Vol. 98 (1). – P. 9-17.
92. Page J. Biosynthesis of terpenophenolic metabolites in hop and cannabis / J. Page, J. Nagel // *Rec. Adv. . Phytochem.* – 2006. – Vol. 40. – 179-210.
93. Patzak J. Study of molecular markers for xanthohumol and DMX contents in hop (*Humulus lupulus* L.) by QTLs mapping analysis / J. Patzak, A. Henychova, K. Krofta et al. // *Brew. Sci.* – 2012. - Vol 65. – P. 96-102.

94. Patzak J. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses / J. Patzak, V. Nesvadba, A. Henychová et al. // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2010. – Vol. 38. – P. 136-145.
95. Patzak J. Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and Caucasus region by chemical and molecular methods / J. Patzak., V. Nesvadba, K. Krofta, A. Henychová et al. // *Genome.* – 2010. – Vol. 53. – P. 545-557.
96. Patzak J. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.) / J. Patzak, I. Vrba, J. Matousek // *Genome.* – 2007. – Vol. 50. – P. 15-25.
97. Peredo E. The influence of European and American wild germplasm in hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars / E. Peredo, M. Revilla, B. Reed et al. // *Genet. Resour. Crop. Evol.* – 2010. – Vol. 57. – P. 575-586.
98. Pionnat S. Ti-plasmids from *Rhizobium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries / S. Pionnat, H. Keller, D. Richer // *Appl. Environm. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65. – P. 4197–4206.
99. Pokorn T. Genotipizacija kultivarjev hmelja fluorescentnimi mikrosatelitnimi markerji / T. Pokorn // *Dipl. delo.* Ljubljana. Univ. v Ljubljani. – 2011. – P. 23.
100. Polley A. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers / A. Polley, E. Seigner, M. Ganal // *Genome.* – 1997. – Vol. 40. – P. 357-361.
101. Roberts M.T. Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil / M.T. Roberts, J.P. Dufour, A.C. Lewis // *J. Sep. Sci.* – 2004. – Vol. 27. – P. 473–478.

102. Schillmiller A.L. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds / Schillmiller A.L, Last R.L, Pichersky E. // *Plant. J.* - 2008. – Vol. 54. – P. 702-711.
103. Schröder J. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions / J. Schröder // *Trends. Plant. Sci.* – 1997. – Vol. 2 (10). – P. 373-378.
104. Schröder J. The family of chalcone synthase-related proteins: Functional diversity and evolution / J. Schröder // *Rec. Adv. Phytochem.* – 2000. – Vol. 34. – P. 55-89.
105. Schröder J. Stilbene and chalcone synthases: related enzymes with key functions in plant-specific pathways / J. Schröder, G. Schröder // *Z. Naturforsch C.* – 1990. - Vol. 45. – P. 5-8.
106. Shephard H. Sexual development and sex chromosomes in hop / H. Shephard, J. Parker, P. Darby et al. // *New Phytol.* – 2000. – Vol. 148. – P. 397–411.
107. Slater S. Reconciliation of sequence data and updated annotation of the genome of *Rhizobium radiobacter* C58, and distribution of a linear chromosome in the genus *Rhizobium* / S. Slater, J.C. Setubal, B. Goodner et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – Vol. 79. – P. 1414–1417.
108. Smith S. Identification of Common Molecular Subsequences / S. Smith, M. Waterman // *J. of Mol. Biol.* - 1981. - Vol. 147. - P. 195–197.
109. Spearman C. The proof and measurement of association between two thing / C. Spearman // *Amer. J. Psychol.* - 1987. – Vol. 100. - P. 441–471.
110. Stajner N. The isolation and characterization of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L) / N. Stajner, J. Jaske, P. Kozjak et al. // *Plant. Science.* – 2005. – Vol. 168. – P. 213-221.
111. Stevens J.F. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus* / J.F. Stevens, M. Ivancic, V. Hsu et. al. // *Phytochemistry.* - 1997. - Vol. 44. – P. 1575–1585.

112. Stevens J.F. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer / J.F. Stevens, A.W. Taylor, J.E. Clawson et al. // J. Agric. Food. Chem. – 1999. – Vol. 47. - P. 2421–2428.
113. Stevens J. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol / J. Stevens, A. Taylor, G. Nickerson et al // Phytochemistry. - 2000. – Vol. 53. - P. 759–775.
114. Stevens J.F. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol / J.F. Stevens, A.W. Taylor, G.B. Nickerson et al. // Phytochemistry. - 2000. – Vol. 53. - P.759–775.
115. Subramoni S. *Rhizobium radiobacter* responses to plant-derived signaling molecules / S. Subramoni, N. Nathoo, E. Klimov et al. // Front. Plant. Sci. – 2014. – Vol. 5. – P. 322.
116. Sun S. Chalcones from *Humulus lupulus*. / S. Sun, S. Watanabe, T. Saito // Phytochemistry. - 1989. – Vol. 28. – P. 1776–1777.
117. Takoi K. Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer / K. Takoi, K. Koie, Y. Itoga et al. // J. Agric. Food. Chem. – 2010. – Vol. 58. – P. 5050-5058.
118. Tamura K. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson et al. // Mol. Biol. Evol. – 2011. – Vol. 28 (10). – P. 2731-2739.
119. Tissier A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? / A. Tissier // Plant J. – 2012. – Vol. 70. – P. 51–68.
120. Tsurumaru Y. HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops / Y. Tsurumaru, K.

- Sasaki, T. Miyawaki et al. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2012. – Vol. 417. – P. 393–398.
121. Urbanczyk H. Physical and gene maps of *Agrobacterim* biovar. 2 strains anol their relationship to biovar chromosomes / H. Urbanczyk, K. Suzuki et al. // *Microbiol.* - 2003. - Vol. 149. - P. 3035-3042.
122. Wang G. Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis / G. Wang, R.A. Dixon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 9914-9919.
123. Wang G. Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop / G. Wang, L. Tian, N. Aziz et al. // *Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 148. – P. 334-357.
124. Wesolowska O. Interaction of prenylated chalcones and flavanones from common hop with phosphatidylcholine model membranes / O. Wesolowska, J. Gasiorowska, J. Petrus, et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1. – P. 173–184.
125. Wibberg D. Complete genome sequencing of *Rhizobium* sp. H13-3, the former *Rhizobium* lupine H13-3, reveals a tripartite genome consisting of a circular and a linear chromosome and a naccessory plasmid but lacking a tumor-inducing Ti-plasmid / D. Wibberg, J. Blom, S. Jaenicke et al. // *J. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 155. – P. 50-62.
126. Wolff H. Xanthohumol uptake and intracellular kinetics in hepatocytes, hepatic stellate cells, and intestinal cells / J. Agric. Food. Chem. – 2011. – Vol. 59. – P. 12893–12901.
127. Xu H. Characterization of the formation of branched short-chain fatty acid:CoAs for bitter acid biosynthesis in hop glandular trichomes / H. Xu, F. Zhang, B.Liu et al. // *Mol. Plant.* – 2013. – Vol. 6. – P. 1301-1317.

128. Yilmazer M. Xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*): *in vitro* and *in vivo* metabolism, antioxidant properties of metabolites, and risk assessment in humans / M. Yilmazer // Ph.D. Thesis. – 2001. – P. 56.
129. Zhu J. The bases of crown gall tumorigenesis / J. Zhu, P.M. Oger, B. Schrammeijer // J. Bacteriol. – 2000. - Vol. 182. – P. 3885–3895.
130. Zuurbier K.W.M. *In-vitro* prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus* / K.W.M. Zuurbier, S.-Y. Fung, J.C.C. Scheffer et al. // Phytochemistry. – 1998. - Vol. 49 - P. 2315–2322.
131. Zuurbier K. Formation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus* / K. Zuurbier, S. Fung, J. Scheffer, R. Verpoorte // Phytochemistry. – 1995. – Vol. 38 (1). – P. 77-82.

ДОДАТОК

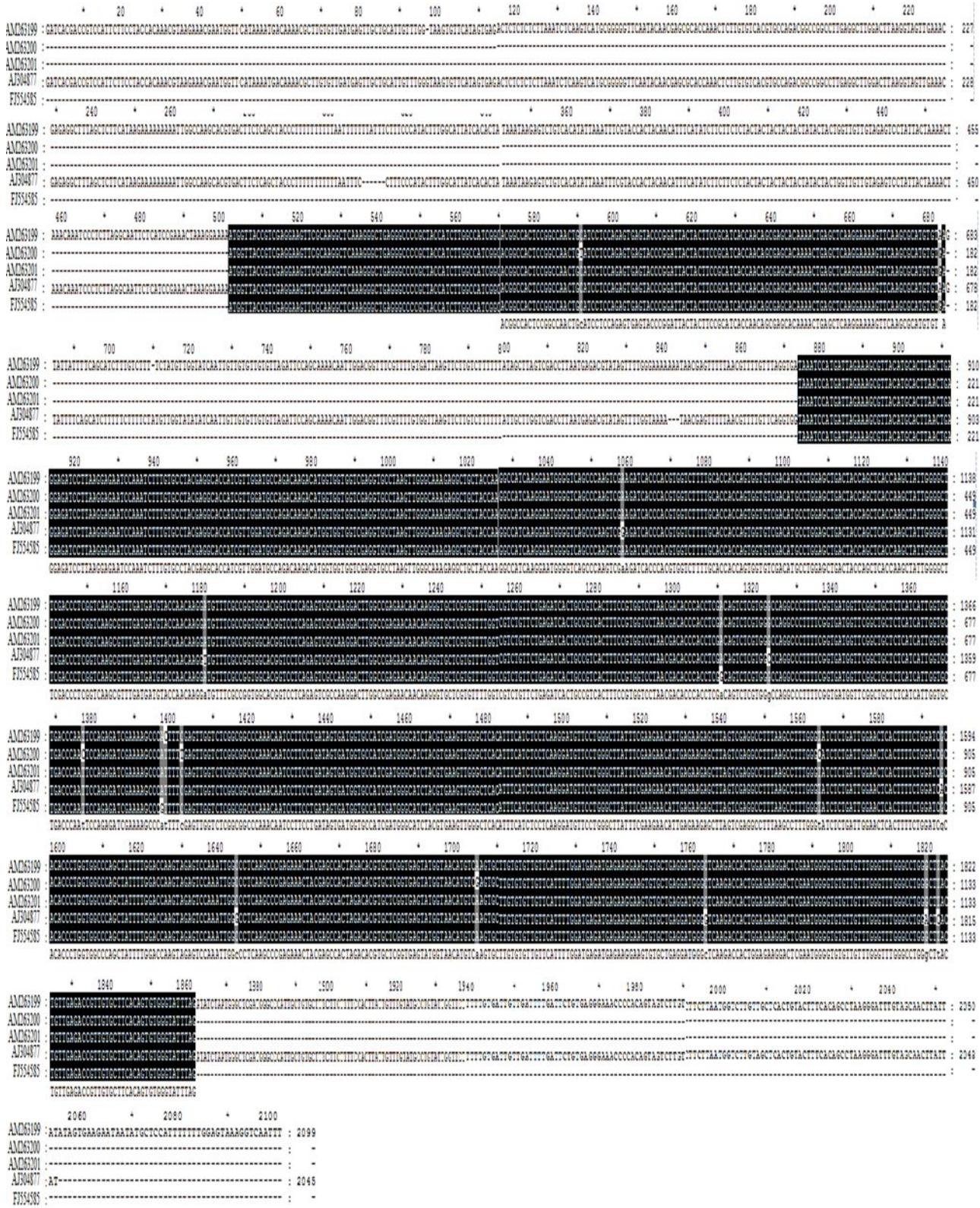


Рис. 1. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *chs_H1*. Чорним кольором показані консервативні ділянки

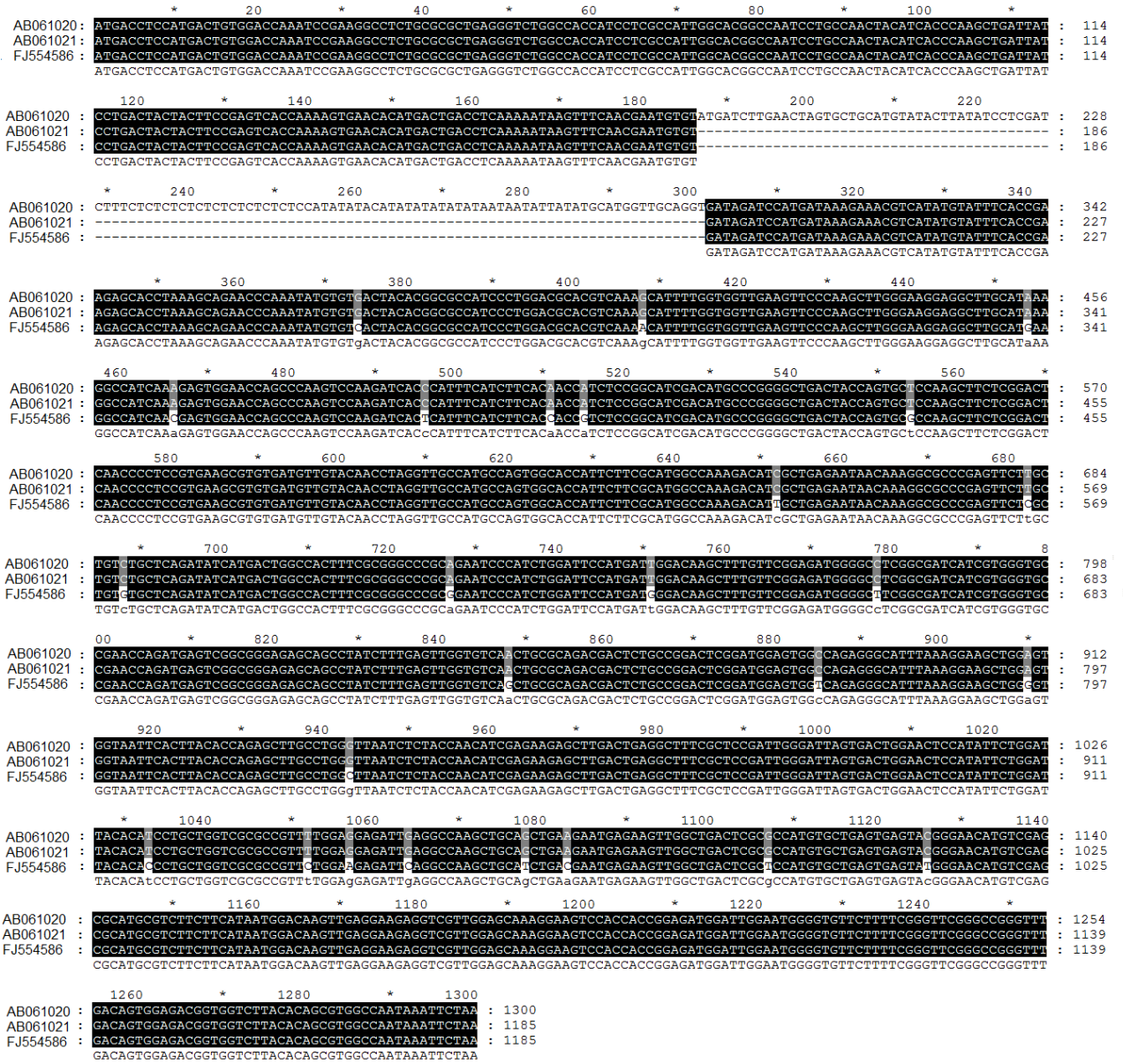


Рис. 2. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *chs2*. Чорним кольором показані консервативні ділянки

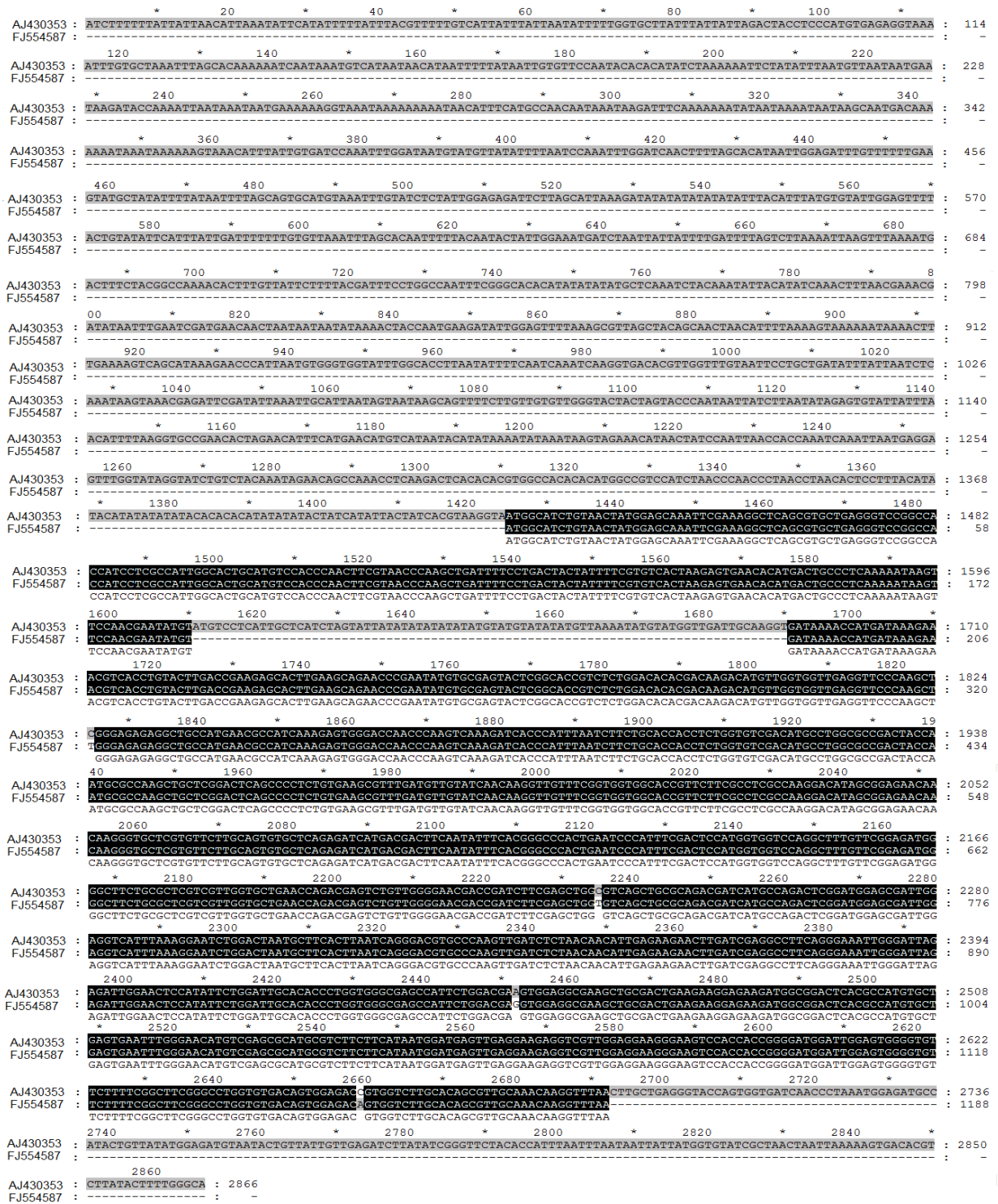


Рис. 3. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *chs4*. Чорним кольором показані консервативні ділянки

```

AB015430 : -----20 40 60 80 100 -----
AB047593 : CTCGAGGAGTTGGAGACTGTCCGAGGTCCTTCTCCTAGGGTGATCACCAGCTCGATAGTCCTATAGCCGTTGATCCTTCTCCCGAAAAACCGCACAGCATCATGGAGGTCGCCT : 116
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----
120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *
AB015430 : -----
AB047593 : TCAGCTCGGGCAGCAGTCAAACCCATCTTCTCCAACGTGGACCGGAATAGAAGGTTTACCGAGCTCCCATTATCGATCAACACCCCTCCTAACCTCCGAATAGCGAGGTGAAGTGCCT : 232
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----
240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340
AB015430 : -----
AB047593 : ACGACCAGAGGGTCGTTATGAGGGAACGTGGACATGGCCCGCATCTTCTCTGTAAAAATGATCGGTTGCCTCTCCAATCGCTGCTTGGCAGACGCTGCTCCGGGACGAACTC : 348
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----
* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460
AB015430 : -----
AB047593 : TACTCCATTATGCGCCTTGAGTTCGTTTACGTATCTCTTTGGGACCCCTACTCACGCTAGCTAAATGCGGACCTCCAGAGATTGTGGATATCTCTCCTCCAATCACTGGAGGAG : 464
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----
* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 * 580
AB015430 : -----
AB047593 : GGACGCTCTGATCTATCCGAGACCCAGAAATCTATACAAAAAAACTATGTATAAGGTTTCATAAACACATTATATTCATTAATTTAACCTTAAAAATAAAAAAATGAAAAAA : 580
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----
* 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *
AB015430 : -----
AB047593 : CTCACCAAATTTGGCTAGGAAGTCGGAGACGCCGCTAGTCTTGGGAGAAAACCTAAGTTTTGAATTTGGGAGAATGAAGGGCTTGGGTCGATGGCTGAGATTTAATACTGGGT : 696
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----
700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *
AB015430 : -----
AB047593 : GCACCTGTTTTCGTTAGTGGGCAACTGACGCTAACGGCTTGTGTCATCAGTGCCAAACTGACGCAAAACACCCGTTAGCGTTAGTGGCCACTGACGCAAAACGGTGCATTAAGAGC : 812
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----

```



```

      820      *      840      *      860      *      880      *      900      *      920
AB015430 : -----
AB047593 : ATCAGTTGGCCACTGACGCAAACCTCACCATAACAGTGTGCTGTTATCACTGATGCAAATGCCCTGAATTTGTGGTAGTACTCACTCCACAAATGCTGATCTCGGTCAA : 928
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----

```

```

      *      940      *      960      *      980      *      1000      *      1020      *      1040
AB015430 : -----
AB047593 : CGGCGTCAGTCAACTGTGTTGAGTGACGCGTTTGACTGACACAAAATAAGTATTTGGTGTAGTGAAGATTAACTAAGAAGGTAAAATGGAGGTTATTGTTATCACTCCTTCAT : 1044
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----

```

```

      *      1060      *      1080      *      1100      *      1120      *      1140      *      1160
AB015430 : -----
AB047593 : CATTATATAAAGTAGAATACGTTCCATTTAATATATACTAACCAACCTTGCTGCCACATATCCCTGAAAAAATAAACAACAACACCTTTCTACCATAAAATTAGGCATATGAT : 1160
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----

```

```

      *      1180      *      1200      *      1220      *      1240      *      1260      *
AB015430 : -----
AB047593 : GATATATAACCTAACTATAACACAAAATTAGGCATATGATGATATATAACCTAACTATAACACAAAATTAGGCATATATATATACACTCACAAATAGTGGCTGCATACCCCAAC : 1276
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----

```

```

      1280      *      1300      *      1320      *      1340      *      1360      *      1380      *
AB015430 : -----
AB047593 : ACCTTAATTAATTAATAGTTAATGCTCCTCTAGAAGACTGGACGAGATCAAGTGTATTTGCGGAATCAAGATCTCCTATCAAAAAAAGATGTCAGCCTATGTTTAGAAAATG : 1392
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----

```

```

      1400      *      1420      *      1440      *      1460      *      1480      *      1500
AB015430 : -----
AB047593 : TTAATCAAAATCTGTTACTAATTTCTATATTTCTCATCCCTACTCCTTTTTTTTAAACAATCACAAATTCATTGAAAATATCAAAATGTAATCAACTAATATATAGATGATA : 1508
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----

```

```

      *      1520      *      1540      *      1560      *      1580      *      1600      *      1620
AB015430 : -----
AB047593 : TATATAGTAACCTATCCATACAAAGTTCATTATCCACTCTAAGTGCATGCACAATTCATGAACGGCCTTATGGCCAAACGTCAAACACAAATAGAGATACCTTAGAAAATGGAT : 1624
EU685789 : -----
EU685790 : -----
EU685791 : -----
EU685792 : -----
EU685793 : -----
EU685794 : -----
EU685795 : -----
EU685796 : -----
EU685797 : -----
EU685798 : -----
EU685799 : -----
EU685800 : -----
FJ554588 : -----

```

```

*      1640      *      1660      *      1680      *      1700      *      1720      *      1740
AB015430 : -----: -
AB047593 : AATAAACTGGTTATATTTCTAACAAAGACCCCTAATTCATTACTACTCCATTAAATGACGTGATCTTTTCATTTTTTTTAAAAATTTTAGAACTAATAGAGTATGGATTGATGC : 1740
EU685789 : -----: -
EU685790 : -----: -
EU685791 : -----: -
EU685792 : -----: -
EU685793 : -----: -
EU685794 : -----: -
EU685795 : -----: -
EU685796 : -----: -
EU685797 : -----: -
EU685798 : -----: -
EU685799 : -----: -
EU685800 : -----: -
FJ554588 : -----: -

```

```

*      1760      *      1780      *      1800      *      1820      *      1840      *
AB015430 : -----: -
AB047593 : TGCATTTATAAGAAATCGATCACACCTTCAGTTATGAACCTTCGGCTAGCACCATCGGGCATCTATGCTCCTCCTTTTGGCCACATTTATCATATGAATACCACTGTTTTCCTCC : 1856
EU685789 : -----: -
EU685790 : -----: -
EU685791 : -----: -
EU685792 : -----: -
EU685793 : -----: -
EU685794 : -----: -
EU685795 : -----: -
EU685796 : -----: -
EU685797 : -----: -
EU685798 : -----: -
EU685799 : -----: -
EU685800 : -----: -
FJ554588 : -----: -

```

```

1860      *      1880      *      1900      *      1920      *      1940      *      1960      *
AB015430 : -----: -
AB047593 : TCTTCCAAGCTTATGGTCAAGACCGGCCCTGAACCTAAGGTGGGTTAGACCCACGCTAGGGCCTATTTTTTTTACATTTCTTTTAAAAAIACTATAAAATTTTTAAAAAGTTTTTA : 1972
EU685789 : -----: -
EU685790 : -----: -
EU685791 : -----: -
EU685792 : -----: -
EU685793 : -----: -
EU685794 : -----: -
EU685795 : -----: -
EU685796 : -----: -
EU685797 : -----: -
EU685798 : -----: -
EU685799 : -----: -
EU685800 : -----: -
FJ554588 : -----: -

```

```

1980      *      2000      *      2020      *      2040      *      2060      *      2080
AB015430 : -----: -
AB047593 : CAAAAAGGGCCCTAATCACCAATTTTTCTAAGGCTCAAACTCTTCAGGGCCAGCCCTGCCTATGGTAGCATATCTAGATTCTAAATCTTGCTTATGAGAACTGCTCGATGCCA : 2088
EU685789 : -----: -
EU685790 : -----: -
EU685791 : -----: -
EU685792 : -----: -
EU685793 : -----: -
EU685794 : -----: -
EU685795 : -----: -
EU685796 : -----: -
EU685797 : -----: -
EU685798 : -----: -
EU685799 : -----: -
EU685800 : -----: -
FJ554588 : -----: -

```

```

*      2100      *      2120      *      2140      *      2160      *      2180      *      2200
AB015430 : -----: -
AB047593 : TAACTTCCCTCGCCACCAAGACTAATAACACAAACAATAGAGAACGAACACACCAATAGCAATACAAAACACCTTACGTCAACTGACCCACAGAGAGCTACCATGTCAAAGACA : 2204
EU685789 : -----: -
EU685790 : -----: -
EU685791 : -----: -
EU685792 : -----: -
EU685793 : -----: -
EU685794 : -----: -
EU685795 : -----: -
EU685796 : -----: -
EU685797 : -----: -
EU685798 : -----: -
EU685799 : -----: -
EU685800 : -----: -
FJ554588 : -----: -

```

```

*      2220      *      2240      *      2260      *      2280      *      2300      *      2320
AB015430 : -----: -
AB047593 : ATACTAGTTTGAGACTTACCACCTGTCAAATTTCTAGTTCTCAACACTAGCAAAAAAAAAGTGTAAACACCATCAATCACATAACGACATACTTCTGGCCATATTTTTTTTCC : 2320
EU685789 : -----: -
EU685790 : -----: -
EU685791 : -----: -
EU685792 : -----: -
EU685793 : -----: -
EU685794 : -----: -
EU685795 : -----: -
EU685796 : -----: -
EU685797 : -----: -
EU685798 : -----: -
EU685799 : -----: -
EU685800 : -----: -
FJ554588 : -----: -

```

```

*      2340      *      2360      *      2380      *      2400      *      2420      *
AB015430 : -----: -
AB047593 : CATGTAATCATGTAAGGTGGGGAAAAATAATCAATACACATAAAGAACAATGAAAAATAAATAAACAGTCAAATTTATATAATTTAACATTAATAAAAAAGTTGAGATCACA : 2436
EU685789 : -----: -
EU685790 : -----: -
EU685791 : -----: -
EU685792 : -----: -
EU685793 : -----: -
EU685794 : -----: -
EU685795 : -----: -
EU685796 : -----: -
EU685797 : -----: -
EU685798 : -----: -
EU685799 : -----: -
EU685800 : -----: -
FJ554588 : -----: -

```

2440 * 2460 * 2480 * 2500 * 2520 * 2540 *

AB015430 : ----- : -

AB047593 : AACATTGGTACGTAGGTATTAGGGTGGTGTTCACACATATTATCCATAGGCCATGCACACCTTACCTAACCATTGCACCCTTTGTACATATATATATATAAATCCCAATTTGGC : 2552

EU685789 : ----- : -

EU685790 : ----- : -

EU685791 : ----- : -

EU685792 : ----- : -

EU685793 : ----- : -

EU685794 : ----- : -

EU685795 : ----- : -

EU685796 : ----- : -

EU685797 : ----- : -

EU685798 : ----- : -

EU685799 : ----- : -

EU685800 : ----- : -

FJ554588 : ----- : -

2560 * 2580 * 2600 * 2620 * 2640 * 2660 *

AB015430 : ----- : -

AB047593 : TTTGCATTCAACACTTGAATCATTACACTATATTGTGTATATAGTGTAGTTTTCACAGTACTACTAGCTATATATATACAGGTAATGGCGTCGGTAACTGTAGAGCAAATC : 2668

EU685789 : ----- : -

EU685790 : ----- : -

EU685791 : ----- : -

EU685792 : ----- : -

EU685793 : ----- : -

EU685794 : ----- : -

EU685795 : ----- : -

EU685796 : ----- : -

EU685797 : ----- : -

EU685798 : ----- : -

EU685799 : ----- : -

EU685800 : ----- : -

FJ554588 : ----- : -

* 2680 * 2700 * 2720 * 2740 * 2760 * 2780 *

AB015430 : ----- : 89

AB047593 : CGAAAGGCTCAGCGAGCTGAAGGTCGGGCCACATCTCTCGCCCTTGGCCACCTTCACCAAGCTGATTTCCTCCACTACTATTTTCGGTGCCCAAAA : 2784

EU685789 : ----- : 110

EU685790 : ----- : 100

EU685791 : ----- : 100

EU685792 : ----- : 100

EU685793 : ----- : 100

EU685794 : ----- : 100

EU685795 : ----- : 100

EU685796 : ----- : 99

EU685797 : ----- : 99

EU685798 : ----- : 99

EU685799 : ----- : 99

EU685800 : ----- : 99

FJ554588 : ----- : 54

ca ca a a t gt a c ccga c t a g

AB015430 : ----- : 203

AB047593 : GGCATCCATCCTGCCATGGCCCTCCGCTTCGGTCCACCTGATGTCACCAAGCGAATTTCCCGGACACACACACACACACACACACACACACACAC : 2900

EU685789 : ----- : 216

EU685790 : ----- : 216

EU685791 : ----- : 216

EU685792 : ----- : 216

EU685793 : ----- : 216

EU685794 : ----- : 216

EU685795 : ----- : 216

EU685796 : ----- : 216

EU685797 : ----- : 95

EU685798 : ----- : 215

EU685799 : ----- : 83

EU685800 : ----- : 215

FJ554588 : ----- : 168

ac ccc t aaagaagtcccaacgAatGtATGtAtatctTctctTTTcttatCatCAactTctTcaactGttAtAGattAttCatttTtATGATgCaAcG

* 2800 * 2820 * 2840 * 2860 * 2880 * 2900 *

AB015430 : ----- : 319

AB047593 : GTGAAAATCCCACTATAAAAAGGCGTACTTGCATTGACCGAAGGAGCATCTGAAGCAGAACCCACATCTGTGCGAGTACACAGCCACACACACACAC : 3009

EU685789 : ----- : 335

EU685790 : ----- : 325

EU685791 : ----- : 325

EU685792 : ----- : 325

EU685793 : ----- : 342

EU685794 : ----- : 325

EU685795 : ----- : 324

EU685796 : ----- : 324

EU685797 : ----- : 204

EU685798 : ----- : 324

EU685799 : ----- : 192

EU685800 : ----- : 324

FJ554588 : ----- : 284

CGGTGCag GTGAAAATCCCACTATAAAAAGGCGTACTTGCATTGACCGAAGGAGCATCTGAAGCAGAACCCACATCTGTGCGAGTACAAATGCCACATCTCTGAAAC

* 2920 * 2940 * 2960 * 2980 * 3000 *

AB015430 : ----- : 435

AB047593 : AGCCCAAGACATGTTGGTGGTGAAGTCCCAGCTTGGGAAGGAGGCTGCAATCAATGCCAACAAGAAATGGGGCCAAACCAAGTCCAAAGTCAACCCATCTCACTTCGACAGC : 435

EU685789 : ----- : 3125

EU685790 : ----- : 451

EU685791 : ----- : 441

EU685792 : ----- : 441

EU685793 : ----- : 458

EU685794 : ----- : 441

EU685795 : ----- : 440

EU685796 : ----- : 440

EU685797 : ----- : 320

EU685798 : ----- : 440

EU685799 : ----- : 308

EU685800 : ----- : 440

FJ554588 : ----- : 400

AGCCCAAGACATGTTGGTGGTGAAGTCCCAGCTTGGGAAGGAGGCTGCAATCAATGCCAACAAGAAATGGGGCCAAACCAAGTCCAAAGTCAACCCATCTCACTTCGACAGC

* 3020 * 3040 * 3060 * 3080 * 3100 * 3120 *

AB015430 : ----- : 551

AB047593 : GGTCCACACGACATGCCAGGAGCCGATTACCAATGCCGCAAGCTTCTGGCCCTCCGACCCCGGTGAAGGAGTGAATGCTGTATCAACTCCGGCTTTATGCCCGTGGAAAAGTT : 551

EU685789 : ----- : 3241

EU685790 : ----- : 567

EU685791 : ----- : 557

EU685792 : ----- : 557

EU685793 : ----- : 574

EU685794 : ----- : 557

EU685795 : ----- : 556

EU685796 : ----- : 436

EU685797 : ----- : 556

EU685798 : ----- : 424

EU685799 : ----- : 556

EU685800 : ----- : 556

FJ554588 : ----- : 516

GTCCTCCACGACATGCCAGGAGCCGATTACCAATGCCGCAAGCTTCTGGCCCTCCGACCCCGGTGAAGGAGTGAATGCTGTATCAACTCCGGCTTTATGCCCGTGGAAAAGTT

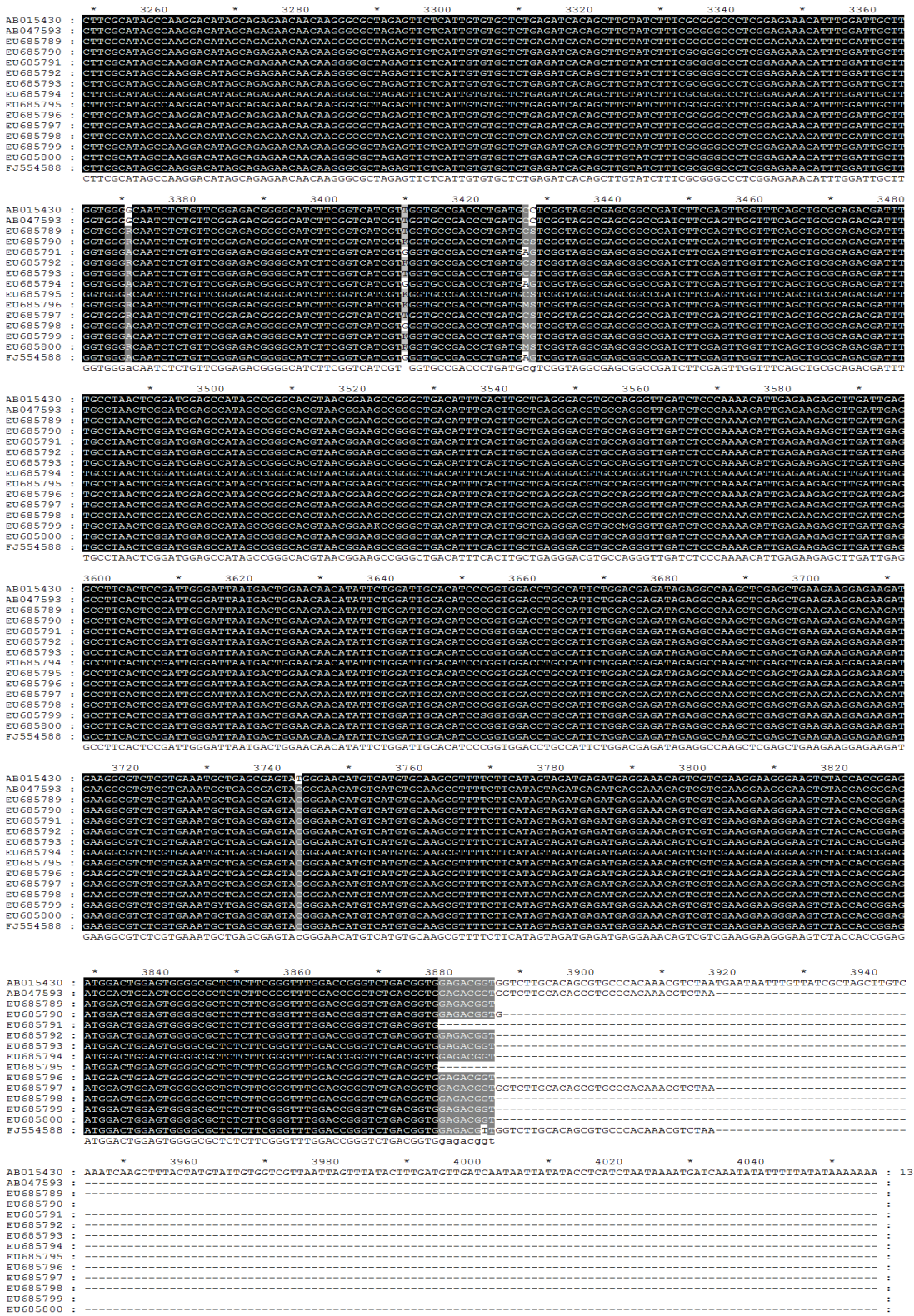


Рис. 4. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *vps*. Чорним кольором показані консервативні ділянки