

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

на правах рукопису

УДК 575.11.113:633.16

КАЛЕНДАР РУСЛАН МИКОЛАЙОВИЧ

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО
ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНОМУ ЯЧМЕНЮ
(*HORDEUM VULGARE L.*) МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ
ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

03.00.26 - молекулярна генетика

АВТОРЕ ФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ 1996



Робота виконана у відділі генної інженерії Селекційно-Генетичного Інституту Української Академії Аграрних наук.

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
професор, член-кор. УААН,
Сиволап Ю.М.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор,
С.С.Мялота

кандидат біологічних наук,
О.М.Живолуп.

Провідна установа: Інститут Генетики і Цитології АН Білорусі

Захист дисертації відбудеться 22 листопада 1996 р.
о ___ годині на засіданні Спеціалізованої ради
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України
за адресою: 252143, м.Київ, вул. Заболотного, 24.
З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
молекулярної біології і генетики НАН України

Аннотация розіслано 22 вересня 1996 р.

Вчений секретар Спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук

Л.Л.Лукаш

Актуальність проблеми. У дослідженні молекулярно-генетичного поліморфізму рослин на протязі останнього часу спостерігається певний прогрес, основою якого слугувало використання ДНК-маркерів, зокрема, тих що виявляються на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Швидкість отримання результатів та дешевизна полімеразної ланцюгової реакції забезпечили перевагу цього методу перед іншими підходами при вивченні генетичного поліморфізму.

Найбільше поширення при дослідженні молекулярно-генетичного поліморфізму отримав варіант полімеразної ланцюгової реакції з одиничним коротким довільним праймером (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA). Перші роботи по використанню RAPD були проведені на сої і мікроорганізмах, де даний метод показав себе як найбільш ефективний спосіб диференціації організмів і їх ідентифікації. Сьогодні вже важко знайти галузь в молекулярній генетиці, де б не використовувався даний метод. Це наочно показано його використанням в проєктах, які мають на меті використання ДНК-маркерів для детального дослідження цінних в народному господарстві організмів.

Мета та задачі роботи. Метою дисертаційної роботи був аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму геному ячменю (*Hordeum vulgare* L.) з допомогою полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами, картування продуктів полімеразної ланцюгової реакції і визначення їх зчеплення з локусами кількісних ознак.

Безпосередніми задачами роботи були:

1. Оптимізація умов полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами: оптимізація реакційного розчину для підвищення виходу та відтворюваності продуктів ампліфікації; підбір температурного режиму полімеразної ланцюгової реакції; підбір умов відтворюваності спектрів електрофоретичного розподілення продуктів ампліфікації.

2. Дослідження міжвидового поліморфізму рослини *Hordeum* L.

3. Дослідження внутрішньовидового поліморфізму виду *Hordeum vulgare* L.

4. Картування геному ячменю з допомогою продуктів RAPD і картування покусів кількісних ознак.

Наукова новизна і практичне значення роботи. Наукова новизна дисертації полягає у використанні розробленої математичної моделі полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами і запропонованої формули для обрахування температури плавлення праймера, в оптимізації умов проведення віджигу. Суттєвим моментом є розробка комп'ютерних програм для обрахування оптимальної температури віджигу для конкретної послідовності праймера. Розроблені комп'ютерні програми для аналізу філогенетичних взаємозв'язків і проведення картування геному ячменю.

Практичне значення полягає в створенні оптимальних умов полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами, що враховують послідовність використаного праймера. Розроблено склад реакційного розчину для полімеразної ланцюгової реакції.

Уточнено походження деяких видів родини *Hordeum* L. і проведено аналіз взаємовідносин ряду сортів виду *Hordeum vulgare*.

Частково картовано геном ячменю, знайдено маркер гену, що кодує ізофермент β -амілазу, і проведено ідентифікацію покусів, що відповідають за кількісні ознаки.

Випробування роботи. Основні результати роботи було викладено на міжнародній конференції "Молекулярно-генетичні маркери і селекція рослин" (Київ, 10-13 травня 1994р.), на міжнародному симпозиумі "Біотехнологія і генетична інженерія рослин" (Київ, 3-6 жовтня 1994р.), на VI міжнародному симпозиумі "Frontiers in biochemistry and molecular biology. The legacy of Andrey Belozersky", Москва, 18-22 грудня, 1995р., на конференції "Наслідки

наукових пошуків молодих вчених-аграрників в умовах реформування АІПК" (Чабани, 1996р.).

Конкретний особистий внесок дисертанта в розробку наукових результатів. Дисертантом була розроблена математична модель полімеразної ланцюгової реакції довільними праймерами, запропонована емпірична формула для обчислення температури плавлення олігонуклеотидного праймера, на основі якої розроблена комп'ютерна програма ("PCR"), оптимізовано умови проведення RAPD; модифіковано метод виділення високомолекулярної рослинної ДНК; синтезовано 77 олігонуклеотидів; досліджено міжвидовий поліморфізм родини *Hordeum* L. та внутрішньовидовий поліморфізм виду *Hordeum vulgare* L.; розроблено комп'ютерну програму для побудови філогенетичних схем походження організмів ("TREE"); проведено моделювання послідовності довільного праймера для виявлення внутрішньо- або міжвидового поліморфізму; картовано геном ячменю з допомогою 21 RAPD-маркера і ідентифіковано локуси кількісних ознак; розроблено комп'ютерну програму для картування ("MAP_QTL").

Структура і склад роботи. Дисертація складається з огляду літератури, матеріалів і методів, експериментальної частини, результатів та їх обговорення, заключення і висновків.

Робота надрукована на 161 сторінках машинописного тексту, містить 25 малюнків і 11 таблиць. Список використаної літератури склав 216 джерел, з них 170 на іноземних мовах.

На захист виносяться:

1. Результати оптимізації умов проведення полімеразної ланцюгової реакції, моделювання полімеразної ланцюгової реакції, розрахунки оптимальної температури ві'язу, підбір оптимального реакційного розчину.

2. Результати дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму між видами родини *Hordeum* L. і внутрішньовидового поліморфізму виду *Hordeum vulgare* L.

3. Дані по картуванню геному ячменю з допомогою самозапильної популяції F₇₋₈, Одеський 115/Гольф, і проведення маркерного аналізу для ідентифікації зчелення молекулярних маркерів і локусів кількісних ознак.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В якості матеріалу для дослідження були використані деякі види роду *Hordeum* L.: *H. agriocrithon* Åberg., *H. spontaneum* C.Koch., *H. laguncifolium* Bacht., *H. vulgare* L., *H. chilense* Roem. et Shult., *H. bulbosum* L., а також *Triticum durum* L. (лінія 350-72), *Triticum aestivum* L. (Одеська напівкарликова), *Secale cereale* L. (Харківська 60).

При дослідженні внутрішньовидової мінливості використовували 21 сорт ярого ячменю: Джау Кабутак, Одеський-31, Одеський-70, Одеський-100, Донецький-8, Донецький-9, Іслок, Ціспон, Черноморець, Вінер, Riso-56, Riso-1508, Нутано-106, Корал, Палідум-32, Палідум-331/13, Betzes, Bomi, Bonus, Athos, Calsberg II.

Для картування локусів кількісних ознак аналізували 150 ліній самозапильної популяції №106 (F₇, F₈, Одеський 115/Гольф), популяцію сорту Productiv, лінії пшениці *Chinese spring* доповнені хромосомами (крім п'ятої) ячменю сорту Betzes, отриманих з відщипів: генетичних основ селекції, селекції ячменю і відділу генетики СГІ УААН м.Одеса.

Виділення високомолекулярної рослинної ДНК здійснювали з етиольованих проростків, які розтирали скляною паличкою в епідорфі з 0.5 мл лізуючого розчину (26 mM Na₂EDTA, 100 mM трис-НСІ, рН 8.0 (25° С), 1.4 М NaCl, 2 % СТАВ) : витримували на протязі години при 60°С. Додавали такий самий об'єм суміші хлороформу і ізопентанолу (24:1) та ретельно перемішували.

ДНК осаджали таким самим об'ємом ізопропанолу після 5 хвилинного центрифугування в настільній центрифугі Eppendorf 5415 при максимальних оборотах. Осад ДНК розчиняли в 500 мкл розчину TE (10 мМ трис-НСІ, рН 8.0 и 1 мМ Na_3EDTA) в присутності 1 мкг/мл РНКази А. Концентрацію ДНК визначали з допомогою флюориметра ТКО 100 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco).

Полімеразна ланцюгова реакція з довільними праймерами проводилась в реакційному розчині в присутності 3 мМ іонів магнію, а при направленій ампліфікації - 1.5 мМ. Температура віджигу при направленій ампліфікації на протязі усієї реакції дорівнювалась 55°C, тоді як для ПЛР з довільними праймерами віджиг на перших чотирьох циклах реакції був нижче оптимальної на 5-10 градусів. Реакційна суміш для полімеразної ланцюгової реакції об'ємом 20 мкл містила: 50 мМ КСІ, 20 мМ трис-НСІ, рН 8.4 (25°C), 3 (1.5) мМ MgCl_2 , 0.01 % Tween-20, 0.15 мМ кожного dNTP, 0.3 мкМ праймера, 5 % гліцерину, 20 нг ДНК и 1 ед. Taq-полімерази. У пробірки напаровували 40 мкл мінерального масла. Ампліфікацію з довільними праймерами проводили наступним чином: перша денатурація - 2 хвилини при 94°C; перші чотири цикли - 94°C, 1 хв., 1.5 хвилини при 40-43°C та 2 хв. при 72°C; в наступних циклах віджиг здійснювали при 47-55°C в залежності від праймера. Проводилось 35 циклів реакції. Остання елонгація тривала 10 хвилин. Продукти ампліфікації фракціонували електрофорезом в 1.5 - 2 % агарозному гелі в 1xTBE (50 мМ трис- H_3BO_3 и 1 мМ ЭДТА- Na_3 , рН 8.0) на протязі 5-7 годин при напрузі 50 вольт і візуалізували бромістим етидієм.

Синтез і очистка шестидесяти восьми праймерів. Праймери довжиною від 10 до 24 нуклеотидів, були синтезовані на автоматичному ДНК - синтезаторі "Applied Biosystems 380 B" ціанофосфорамідитним методом. Розчини фосфорамідитів в ацетонітрилі готували до концентрації 50 мг на 1 мл. Використовували колонки для твердофазного синтезу олігонуклеотидів ємкістю 0.2 мкМ (Applied Biosystems), з виходом до 15 О.Б. (33 мкг олігонуклеотиду на 1 О.Б.). Короткі олігонуклеотиди (10-15 нуклеотидів) не вимагали очистки,

тому синтез закінчувався зняттям всіх захисних (трیتیльних) груп (trityl-off). Синтез більш довгих олігонуклеотидів ви: згав очистки на колонках OPC (Oligonucleotide Purification Cartridges), тому синтез закінчували без зняття трітилу (trityl-on). Очистку trityl-off олігонуклеотидів можна проводити з допомогою електрофорезу в денатуруючому поліакриамідному гелі з 7М сечовиною) і екстракцією водою з гелю.

Комп'ютерний аналіз отриманих результатів здійснювали з допомогою програм: "PCR" - для оптимізації умов віджигу ПЛР; "TREE" - для побудови схем філогенетичних взаємовідносин у досліджуваних форм; "MAP_QTL" - для картування.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Оптимізація умов проведення полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами.

Розроблено модель полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами. На протязі перших двох циклів реакції утворюються дволанцюгові молекули ДНК, що містять містечкі (некомплементарні нуклеотиди) та довгі некомплементарні кінці. При подальшій ампліфікації з таких молекул утворюється істинний продукт ампліфікації, з повністю комплементарною послідовністю. Через це перші два цикли реакції необхідно проводити при температурі віджигу нижче оптимальної для даного праймера. Надальні віджиги проводять при оптимальних умовах.

При обчисленні оптимальної температури віджигу необхідні дві умови: знання нуклеотидної послідовності праймера і продукту ампліфікації (Rychlik et al., 1990). Використовувати роботу Rychlik et al., (1990) для визначення температури плавлення праймера складно (помилка в формулі або при друці), тому було запропоновано впасти емпіричну формулу, отриману на основі цієї роботи:

$$Tm^{primer} = -k \frac{dG}{l^{3.513}}$$

де $k=2.9136826$, l - довжина праймера (в нуклеотидах), якщо концентрація іонів калію в розчині рівна 50 мМ, dG - вільна енергія Гібса (Breslauer et al., 1986).

Обрахунки температури плавлення продукту ампліфікації проводили при усереднених даних: 50% ГЦ-складу і розмір від 200 до 2000 пар нуклеотидів.

Таким чином, для кожного праймера вирахована оптимальна температура відркгу. Виявилось, що для 10-члених праймерів вона складає не 37°C (Williams et al., 1990), а від 45 до 52°C. При проведенні RAPD в таких умовах утворювалось від 1 до 30 відтворюваних продуктів, в залежності від послідовності праймера.

При оптимізації реакційної суміші було запропоновано склад: 50 мМ KCl, 20 мМ тріс-HCl, рН 8.4 (25°C), 3 мМ MgCl₂, 0.01 % Tween-20, 5% гліцерину и 5% PEG 6000. Концентрація ДНК - 1 нг на 1 мкл реакційної суміші, а кількість Taq-полімерази - 1 од. на 20 мкл реакційної суміші. Показано, що 4-6% PEG 6000 значно поліпшує ефективність реакції (до 100 разів), тобто ефективність реакції наблизилась до значення 2ⁿ-2п.

2. Дослідження міжвидового поліморфізму родинки *Hordeum* L.

При виявленні поліморфізму серед сортів ячменю *Hordeum vulgare* Суло показано поліморфізм лише для 50% праймерів (34 з 68). Праймери, що не виявляють внутрішньовидовий поліморфізм, можуть детектувати останній між видами родини *Hordeum* (*H. agriocrithon*, *H. spontaneum*, *H. lagunculiforme*, *H. vulgare*, *H. chilense*, *H. bulbosum*), а також між іншими злаками *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Zea mays* та у сої *Glycine max*.

Цей факт ілюструє положення про специфічність довільних праймерів в виявленні поліморфізму. Внутрішньовидоспецифічні (сортоспецифічні) праймери виявляють поліморфізм серед сортів одного виду, видоспецифічні

праймери детектують поліморфізм між видами і показують дуже слабкий поліморфізм серед сортів даного виду.

Перевірка специфічності праймерів здійснювалася на 21 сорті з різних еколого-географічних зон вирощування, наприклад Одеський 100 (Україна), Сувенір (Білорусія), Тріумф (Німеччина), Палідум 18 (Росія). Праймери, що не виявили поліморфізм серед даних сортів і детектують міжвидовий поліморфізм, вважались видоспецифічними. Видоспецифічність праймера визначається відношенням консервативних ампліконів (продукти ампліфікації) до поліморфних. Чим більше консервативних ампліконів виявляє праймер всередні виду, тим більш ймовірно, що даний праймер є видоспецифічним. Видоспецифічний праймер обмежує консервативні всередні виду і варіабельні між видами послідовності. Кількість ампліконів залежить від послідовності праймера і структури геному. Наприклад, сортоспецифічний праймер P56 при ампліфікації з ДНК ячменю утворював 4 амплікони, два з них виявились поліморфні: 840 і 760 пар нуклеотидів, в той час праймер P79 при ампліфікації утворював 10 поліморфних з 25 ампліконів. Специфічність праймера визначається на основі аналізу ампліконів у набору генотипів:

$$Is = \frac{2P}{N},$$

де I_s - індекс специфічності праймера, P - кількість поліморфних полос, N - загальна кількість полос.

Значення I_s рівне 0 відповідає відсутності поліморфних полос, і максимальне значення рівне 2 приймає при наявності всіх поліморфних полос.

Цікава закономірність специфічності довідних праймерів показана серед вищезказаних видів. Якщо уявити наступний ряд розташування цих видів зі збільшенням рівня внутривидового поліморфізму: соя \Rightarrow ячмінь \Rightarrow пшениця \Rightarrow кукурудза, то праймери, які виявляють сортоспецифічний поліморфізм у сої або ячменю, будуть виявляти такий самий і у пшениці, і у кукурудзі. Праймери, що не виявляють сортоспецифічний поліморфізм у пшениці або ячменю, не виявлять його і у сої. Тому сортоспецифічні праймери ячменю годяться для дослідження внутривидового поліморфізму у сої,

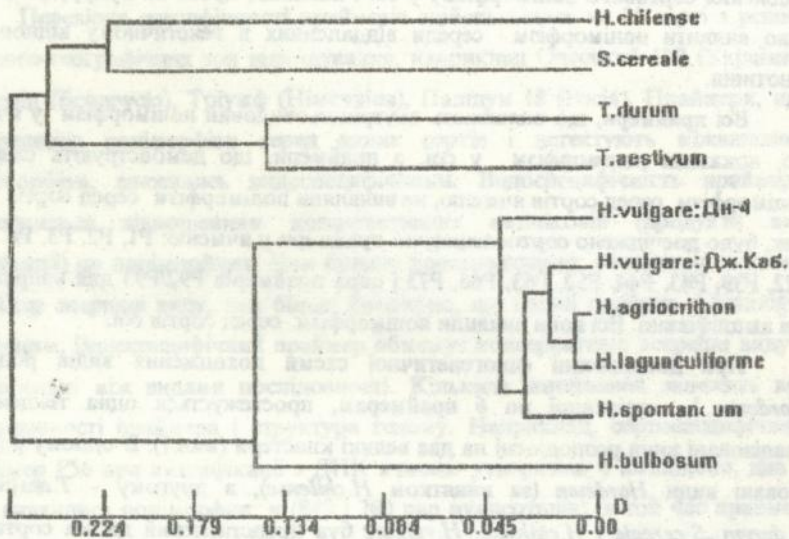
пшениці і кукурудзи; видоспецифічні праймери ячменя не придатні для дослідження сортового поліморфізму у сої і пшениці, проте на кукурудзі можливо виявити поліморфізм середі віддалених в генетичному відношенні генотипів.

Всі праймери, що виявляють внутрішньовидовий поліморфізм у ячменю, показали поліморфізм у сої, а праймери, що демонструють слабкий поліморфізм серед сортів ячменя, не виявляли поліморфізм серед сортів сої. Так, було досліджено сортоспецифічні праймери у ячменю: P1, P2, P3, P6, P8, P22, P39, P43, P44, P52, P63, P66, P73 і пара праймерів P92/P93 для направленої ампліфікації. Всі вони виявили поліморфізм серед сортів сої.

При дослідженні філогенетичної схеми походження видів родини *Hordeum* L., отриманої по 6 праймерам, простежується одна тенденція: аналізовані види розподілені на два великі кластери (мал.1). В одному розташовані види *Hordeum* (за винятком *H. chilense*), в другому - *T.aestivum*, *T.durum*, *S.cereale* і *H.chilense*. *H.vulgare* був представлений двома сортами: Донецьким 4 і Джау Кабутак, що характеризуються досить сильними морфологічними і генетичними відмінностями (Сиволоп та Календар, 1995). Джау Кабутак - місцевий сорт високогірних районів Таджикистану, шестирядний, голозерний; Донецький 4 - дворядний, півчатий.

Аналіз кластера, що містить види *Hordeum*, показав, що найменші генетичні дистанції відмічено між *H.agriocrithon* і *H.lagunculiforme*, з якими поруч розташовується сорт Джау Кабутак (*H.vulgare*). *H.spontanum* ближче до даного субкластера, ніж сорт Донецький 4 (*H.vulgare*). *H.bulbosum* росташовується дуже відокремлено від цих видів.

H.spontanum розглядається як здичавілий культурний ячмінь з характерним йому ломким колосом, опушенням по ребрам колосових члеників. Шестирядний з ломким колосом *H.agriocrithon* було виявлено на території Тибету С. Обергом. За виповненістю та формою зернівки *H.agriocrithon* близький до культурного ячменя.



мал.1. Дендрограма міжвидових взаємовідносин побудованих на основі аналізу генетичних дистанцій.

За різноманітністю форм *H. agriocrithon* робиться висновок про вторичне походження даного виду (Трофімовська, 1972).

Результати філогенетичного аналізу дозволяють підтвердити думку, що *H. spontaneum*, *H. agriocrithon* и *H. lagunculiforme* найбільш ймовірно, є зди-чавілими формами *H. vulgare*, що відділилися не дуже давно (про це говорить той факт, що сорт Джау Кабутак має більше спільного з ними, ніж з су-часними сортами), а також що *H. bulbosum* який значно відрізняється феноти-

пічно від культурного ячменю, відрізняється і генетично, а *H. chilense* ближче до *S. cereale* та пшениці, ніж до інших ячменів.

3. Дослідження внутрішньовидового поліморфізму виду *H. vulgare* L.

При дослідженні внутрішньовидового поліморфізму виду *H. vulgare* використовували 21 сорт, ці сорти походили з різних еколого-географічних зон.

Так, місцевий сорт Таджикистану Джау Кабутак досліджувався як при вивченні еволюційних взаємовідносин між видами родини *Hordeum* L., так і для аналізу внутрішньовидових взаємовідносин. Палідум 32 - місцевий сорт Криму; Вінер виведено на Фаленській Державній селекційній станції з місцевих сортів і районований більш ніж в 60 областях бывшего СРСР (чорноземна полоса Європейської частини, північ центрального Чорнозем'я, Далекий Схід); Нутанс 106 (отриманий з Одеського 18 і місцевого сорту Черкаської області), Черноморець (Южний/Нутанс 215) виведено у Всесоюзному Селекціоно-генетичному інституті і районований в Одеській області. Корал виведено в Чехословаччині, Athos - в Кенії; Riso 1508 і Bomi виведено у Німеччині, причому, перший є мутантом останнього; сорт Riso 56 є мутантом сорту Calsberg II, виведених також у Німеччині, Betzes виведено в Канаді. Крім цього, для аналізу було використано сорти - Одеський 31, Одеський 70, Одеський 100, Донецький 9, Донецький 8, Істок, Циклон.

Дослідження внутрішньосортової мінливості виду *H. vulgare* проводилось на вищевказаних сортах з допомогою RAPD, використовуючи сорто-специфічні довільні праймери (P1, P2, P3, P4, P6 та P8). У 21 проаналізованого сорту розглянуто 168 локусів. Кількість полос на зразок складала від 25 до 30, з них поліморфних - 41 %. Суттєвий внесок у виявлений рівень внутрішньовидового поліморфізму вніс сорт Джау Кабутак, який виявив велику кількість поліморфних полос. Індекс специфічності праймерів склав 1.05, що нижче для значення I_s , отриманого на видах *Hordeum* L. (1,72). Так, праймер P8, виявивши високий поліморфізм у видів ($I_s=1,76$), серед сортів показав дану

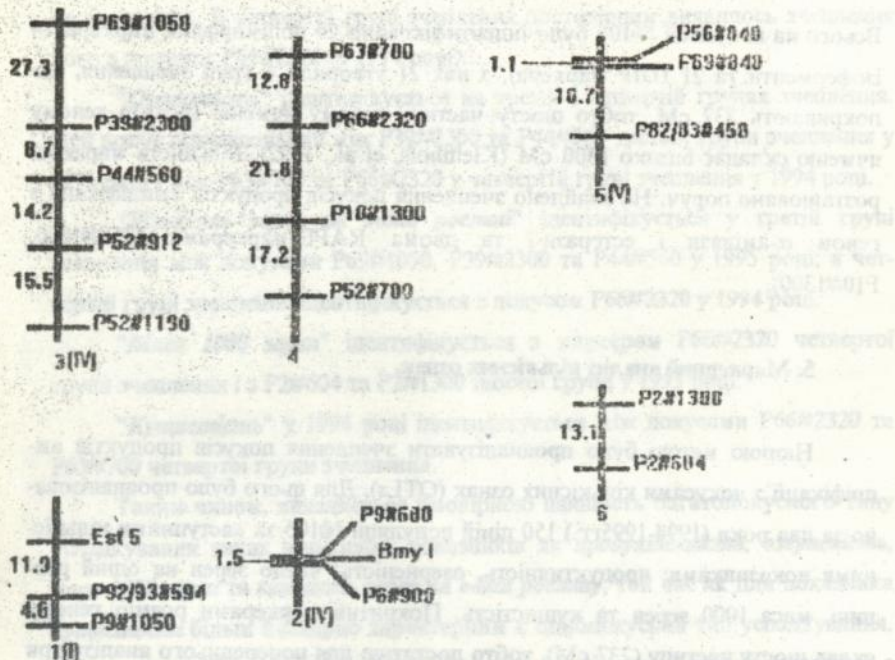
величину рівною - 0,92. Це стосується і праймера Р6 (Іs знизився з 1,67 до 0,80).

Діапазон генетичної дистанції, розрахований за даними RAPD між сортами, нижче, ніж міжвидовий. Незначною мірою різняться генотипи вихідних сортів і отриманих з них мутантів. Це показано для сортів Riso1508 и Bomi, а також Riso 56 та Salzberg П. Дендрограма ілюструє значне віддалення сорту Джау Кабутак, який помітно відрізняється від сортів європейської селекції за морфологічними ознаками (наприклад, голозерність, шестирядність). Інші 20 сортів групуються в один великий кластер, в якому тільки Athos, виведений в Кенії, деякою мірою віддалений. Сорти Донецький 8 та Донецький 9, спільним предком яких є сорт Донецький 4, знаходяться на дендрограмі досить далеко один від одного. Одеський 70 більш близький до німецьких сортів Riso 1508 та Bomi, що мають спільно предка - сорт Юніор. Це може свідчити про те, що дані сорти, хоча і виведені в різних регіонах, мають спільне походження.

4. Картування продуктів ПЛР з допомогою самозатягливої популяції F₇₋₈, Одеський 115/Гольф (популяція №106).

При аналізі зчеплення продуктів ампліфікації ДНК і ферментів було встановлено, що ген β-амілази ячменю, локалізований у довгому плечі хромосоми 4 (4M) (NABGMP, 1994), тісно зчеплений з локусом продукту Р6#900 (пазва праймера#розмір продукту в нуклеотидах). Було визначено, також, інший маркер гєну β-амілази - Р9#680, що розташований на відстані 1% рекомбінації (мал.2)

Виявлено, що з геном *Eat 3*, який контролює синтез естерази 3, зчеплений локус, який маркується продуктами ампліфікації - Р92/93#594 та Р9#1150, які виявлені за допомогою пари праймерів Г22 і Р93 та довільним праймером Р9. Дані генетичні фактори *Eat 3*, Р92/93#594 та Р9#1150 розташовані в короткому плечі хромосоми 1.



мал.2. Шість груп зчеплення, отриманих за даними самозаливної популяції *F₂* Одеської 115/Гольф.

Третя група зчеплення складатиметься з п'яти локусів: P69#1050, P39#2300, P44#560, P52#912 та P52#1190.

Четверта група зчеплення: P63#700, P66#2320, P10#1300 та P52#700.

П'ята: P56#840, P69#840, P82/83#450 та P39#1188.

Шоста група зчеплення складатиметься з двох RAPD локусів: P2#804 та P2#1300, ампліфікованих за допомогою праймера P2.

Оцінка зчеплення показала, що локуси *Est I* і *Amy I* успадковуються незалежно від усіх приведених ПЛР продуктів.

З 68 довільних праймерів [7] показали поліморфізм між лініями популяції №106. Із 19 пар напрямлених праймерів поліморфними вичлились дві:

Всього на популяції №106 було ідентифіковано 25 поліморфних маркерів (4 ізоферменти та 21 ПЛІР маркера), з них 21 утворили 6 груп зчеплення, що покривають 237 сМ, тобто шосту частину геному ячменю (розмір геному ячменю складає близько 1300 сМ (Kleinhofs, et al., 1992). Більшість маркерів розташовано поруч. Не знайдено зчеплення локусів продуктів ампліфікації з геном α -амілази і естерази-І та двома RAPD-маркерами (P57#1000, F10#1300).

5. Маркерний аналіз кількісних ознак.

Нашою метою було проаналізувати зчеплення локусів продуктів ампліфікації з локусами кількісних ознак (QTLs). Для цього було проаналізовано за два роки (1994-1995гг.) 150 ліній популяції №106 за наступними кількісними показниками: продуктивність, озерненість, число зерен на одній рослині, маса 1000 зерен та кущистість. Покритий маркерами розмір геному склав шосту частину (237 сМ), тобто достатню для попереднього аналізу при визначенні зчеплення QTLs з мелекулярними маркерами. Для цього проводили статистичний аналіз середніх величин між алелями маркеру, використовуючи t-критерій Ст'юдента та F-критерій Фішера (Лакін, 1990).

У ході роботи було отримано наступні результати.

а) Всі кількісні показники, які виявили зчеплення з певними маркерами за один рік можуть не ідентифікуватися в наступні роки.

б) Достовірні результати по t-критерію на високому рівні значущості інколи були недостовірними за F-критерієм.

в) Основні достовірні дані отримані для третьої, четвертої та шостої груп зчеплення.

Кількісний показник "продуктивність" достовірно проявився в третій і четвертій групах зчеплення. Даний показник, локалізований між локусами R69#1050 та R39#2300 і відноситься до третьої групи зчеплення, є достовірним тільки для 1995 року. У 1994 році даний показник в цій групі зчеплення

не проявився. В четвертій групі зчеплення достовірним виявилось зчеплення його з локусом R66#2320 (у 1994 році).

"*Озерненість*" ідентифікується на третій і четвертій групах зчеплення. Цей локус локалізований між R39#2300 та R44#560 третьої групи зчеплення у 1995 році і між R63#700 та R66#2320 у четвертій групі зчеплення у 1994 році.

"*Кількість зерен на одній рослині*" ідентифікується у третій групі зчеплення між локусами R69#1050, R39#2300 та R44#560 у 1995 році; в четвертій групі зчеплення ідентифікується з локусом R66#2320 у 1994 році.

"*Маса 1000 зерен*" ідентифікується з маркером R66#2320 четвертої групи зчеплення і з R2#604 та R2#1300 шостої групи у 1995 році.

"*Кущистість*" у 1994 році ідентифікується між локусами R66#2320 та R63#700 четвертої групи зчеплення.

Таким чином, виявляється ймовірною наявність багатолокусного типу успадкування таких кількісних показників як *продуктивність, озерненість, маса 1000 зерен та кількість зерен на одній рослині*, той час як для показника *кущистості* більш ймовірно характерним є однолокусний тип успадкування. Локуси першої групи ознак були віднесені до четвертої групи зчеплення з маркером R66#2320 та до третьої групи зчеплення - з маркерами R69#1050, R39#2300, R44#560 (*продуктивність, озерненість, кількість зерен на одній рослині, маса 1000 зерен*), до R2#604 та R2#1300 шостої групи (*маса 1000 зерен*). Локуси другої групи ознак асоціюють тільки з маркером R66#2320, до того ж проява цих ознак залежить від впливу зовнішнього середовища.

Маркери - R66#2320, R69#1050, R44#560 та R39#2300 можна рекомендувати для аналізу селекційно-генетичного матеріалу.

ВИСНОВКИ

Дослідження між- та внутривидової мінливості і картування геному ячменю (*H. vulgare*) методом полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами дозволило зробити наступні висновки:

1. Для оптимізації умов проведення полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами на основі розробленої математичної моделі RAPD необхідно в перших двох циклах реакції проводити віджиг при температурі нижче ніж оптимальна для даного праймера. На основі аналізу процесу ампліфікації запропоновано емпіричну формулу обчислення температури шавлення олігонуклеотидів, яка необхідна для визначення оптимальної температури віджигу праймера і матриці. Запропоновано модифікований метод вищлення високомолекулярної ДНК, реакційний склад для полімеразної ланцюгової реакції, що містить крім відомих компонентів (гліцерин, Tween-20) поліетиленгліколь.

2. Запропоновано підхід для виявлення поліморфізму послідовності праймера при RAPD. Праймери, що виявляють сортоспецифічний поліморфізм у слабкополіморфних видів (строгі самозапилювачі), виявлять такий самий і у середньо- та високополіморфних близькопоряднених видів (перехреснозапилювачі).

3. Досліджено міжвидовий поліморфізм роду *Hordeum* L. Підтверджено положення про те, що дикі види ячменів (*H. spontaneum*, *H. agriocrithon* і *H. laguncifforme*) походять від культурного *H. vulgare*. Розроблено комп'ютерну програму для дослідження філогенетичних взаємовідносин, що базуються на кластерному аналізі.

4. При дослідженні внутривидового поліморфізму *H. vulgare* на 21 сорті показано відокремлене положення сорту Джау Кабутак, який ближче за походженням до диких ячменів, ніж до сучасних сортів.

5. При картуванні геному ячменю за допомогою RAPD-маркерів, на 150 лініях самозапилюючої популяції F_{7.4}, Одеський 115Гольф локалізовано 21

RAPD-маркер на шести групах зчеплення. Сумарний розмір, що покривається молекулярними маркерами, дорівнює 237 сМ. Ідентифіковано молекулярний маркер тісно зчеплений з геном, що кодує В-амілазу.

6. В результаті кількісного аналізу 150 ліній самоопильної популяції *F₂*, Одеський 115Гольф за 1994 і 1995 роки ідентифіковані локуси кількісних ознак у 3, 4 та 6 групах зчеплення.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами. // Цитология и Генетика. - 1994. - Т.28. - №6. - С.54-61.

2. Календарь Р.Н., Сиволап Ю.М. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами. // Биополимеры и Клетка. - 1995. - Т.11. - №3-4. - С.55-65.

3. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н. Генетический полиморфизм ячменя, выявляемый ПЦР с произвольными праймерами. // Генетика. - 1995. - Т.31. - №10. - С.1358-1364.

4. Календарь Р.Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграм ДНК и белков. // Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений: Тез. докл. конференции 10-13 мая 1994 г. - Киев. - С.25-26.

5. Чаплия А.Е., Календарь Р.Н., Нецветьев В.П., Сиволап Ю.М. Генетический контроль α -амилаз и продуктов амплификации с единичным произвольным праймером у ячменя. // Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений: Тез. докл. конференции 10-13 мая 1994 г. - Киев. - С.73-74.

6. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н. Генетический полиморфизм злаков, детектируемый полимеразной цепной реакцией со случайными праймерами.

// Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений: Тез. докл. конференции 10-13 мая 1994 г. - Киев. - С.59.

7. Чапля А.Е., Календар Р.М. Картування геному ячменю та ідентифікація локусів кількісних ознак за допомогою ізоферментів та полімеразної ланцюгової реакції з довільними праймерами. // Наслідки наукових пошуків молодих вчених-аграрників в умовах реформування АПК: Тези докл. конференції 1996 р. - С.215.

8. Netsvetaev V.P., Kalendar R.N., Sivolap Yu.M. β -amylase polymorphism in barley is detected by PCR with an arbitrary primer. // Barley Genetics Newsletter. - 1995. - V.24. - P.80-83.

9. Sivolap Yu., Chebotar S., Kalendar R.N., Kozhukova N. Inter- and intraspecies genome changeability of some cultivated cereals. // VI International Conference "Frontiers in biochemistry and molecular biology. The legacy of Andrey Belozersky", Moscow, 18-22 December, 1995.

Kalendar R.N. Investigation of the molecular-genetics polymorphism genome of barley (*Hordeum vulgare* L.) by polymerase chain reaction.

Dissertation for scientific degree of candidate of biological sciences on speciality 03.00.26 - Molecular Genetics. Plant Breeding & Genetics Institute UAAS. Odessa, 1996.

Dissertation contains a theoretical and experimental material for using the polymerase chain reaction with arbitrary primers (RAPD) for research the phylogenetics inerralations between some genera family *Hordeum* L., and study intraspecies polymorphism of *H.vulgare* L., mapping of the genome of barley (*H.vulgare* L.).

Model of polymerase chain reaction with arbitrary primers is submitted, formula for calculation the temperature of malting oligonucleotides primes and is offered conditions of realization RAPD.

For mapping of polymorphic products RAPD used self-pollinated population, F_{1,3} from crossing Odessky115/Golf. Markers with known localization served genes, coding isozymes: α -amylase I, β -amylase I, esterase I and 5. It is used 66 arbitrary primers and 10 pairs primers for directed amplification. 12 arbitrary primers and 2 pairs directed primers have shown polymorphism. On the basis of 19 RAPD markers and 2 isozymes (β -amylase, esterase 5) is determined 6 groups of linkage, a covering the sixth part of barley genome (237 cM). One of 21 polymorphic product amplification, is inherit as codominant. It is established (installed), that RAPD-marker P6#900 is closely linked with gene coding β -amylase *Bmy1*. Theoretical aspects of use of RAPD for genetic analysis are discussed.

KEY WORDS: genetics polymorphism, polymerase chain reaction, molecular-genetics markers, mapping, quantitative trait loci, barley.

Кялендарь Р.Н. "Исследование молекулярно-генетического полиморфизма генома ячменя (*Hordeum vulgare* L.) методом полимеразной цепной реакции".

Диссертация на соискания ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.26 - молекулярная генетика. Селекционно-генетический институт УААН, Одесса, 1996.

Представляется к защите диссертация, которая содержит теоретический и экспериментальный материал по использованию полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами (RAPD) для исследования филогенетических взаимоотношений некоторых видов роду *Hordeum* L. и изучению внутривидового полиморфизма *H.vulgare* L., а так же по картированию генома ячменя *H.vulgare* L. и идентификации локусов количественных признаков.

Представлена модель полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами, предложена формула для вычисления температуры плавления олигонуклеотидного праймера и оптимизированы условия проведения RAPD.

Для картирования локусов полиморфных продуктов ПЦР использовали самоопыляющуюся популяцию F₁з, полученную от гибридизации Одесского115/Гольф. Маркерами с известной локализацией служили гены, кодирующие изоферменты: α-амилазу I, β-амилазу I, эстеразы I и 5. Использовали 66 произвольных единичных праймеров и 10 пар праймеров для направленной амплификации. 12 произвольных и 2 пары направленных праймеров показали полиморфизм. На основе 19 ПЦР маркеров и 2 изоферментов (β-амилаза, эстераза 5) определено 6 групп сцепления, покрывающих шестую часть генома ячменя (237 cM). Найден один из 21 полиморфного продукта амплификации, наследуемый по кодоминантному типу. Установлено, что ПЦР маркер R6#900 тесно сцеплен с геном кодирующим β-амилазу *VmtI*. Обсуждаются теоретические аспекты использования продуктов ПЦР для генетического анализа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: генетический полиморфизм, полимеразная цепная реакция, молекулярно-генетические маркеры, картирование, локусы количественных признаков, ячмень.

438898

AB 35.465

AB 35.465