

**ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ХАЛКОНСИНТАЗИ, ТА ЙОГО
ЗВ'ЯЗОК З РІВНЕМ ГІРКИХ РЕЧОВИН ШИШОК ХМЕЛЮ
ЗВИЧАЙНОГО**

А.М. Венгер, молодший науковий співробітник

Н.Е. Волкова, доктор біологічних наук

*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства
та сортовивчення*

Проведений аналіз поліморфізму генів, що кодують халконсинтази, у сортів хмелю звичайного української селекції. Встановлено залежність між поліморфізмом цих генів та рівнем гірких речовин у складі шишок хмелю. Показана можливість використання молекулярних маркерів, які виявляють поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, для визначення типу (гіркий або ароматичний) сорту хмелю звичайного.

Ключові слова: *хміль звичайний, халконсинтази, поліморфізм, гіркі та ароматичні сорти, кластерний аналіз.*

Хміль звичайний *Humulus lupulus* L. – цінна сільськогосподарська культура, що використовується у різних галузях господарства, особливо в харчовому, медичному та парфумерному напрямках. Використання хмелю звичайного в господарстві зумовлене більшою мірою наявністю в його шишках гірких α - і β -кислот (зокрема, когумулону та колупулону) й ароматичних речовин – пренілфлавоноїдів [8]. Ключовими ферментами в синтезі цих речовин є халконсинтази. У хмелю звичайного відомо п'ять халконсинтаз –

халконсинтаза 1 (CHS_H1), халконсинтаза 2 (CHS2), халконсинтаза 3 (CHS3), халконсинтаза 4 (CHS4), валерофенонсинтаза (VPS), що кодуються генами відповідно *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps* [6]. У літературі описаний поліморфізм цих генів, визначений за дослідження сортів хмелю звичайного з різних країн світу [2, 5, 6, 8].

Залежно від співвідношень α - і β -кислот у складі шишок сорти хмелю звичайного поділяють на гіркі та ароматичні [11]. Масова частка когумулону в складі α -кислот становить менше 30% у ароматичних сортів та більше 30% у гірких. Масова частка колупулону в складі β -кислот менше 50% в ароматичних сортів та більше 50% у гірких. Співвідношення кількості β -кислот до α -кислот у ароматичних та гірких сортів дорівнює відповідно менше 0,9% і більше 0,7%,. Пренілфлавоноїди та α - і β -кислоти не є прекурсорами ефірної олії, проте рівень α - і β -смол (похідних α - і β -кислот) прямо пов'язаний з рівнем ефірної олії [11].

Визначення рівня α - та β -кислот проводиться методами газової та вискоефективної рідинної хроматографії, яка є дорогою та довготривалою процедурою [8, 1]. Незважаючи на значний обсяг молекулярно-генетичних та біоінформатичних досліджень геному хмелю, огляд літератури показав відсутність робіт, присвячених розробці молекулярних маркерів для ідентифікації типу сорту. Тому мета дослідження полягала в оцінюванні можливості визначення типу сорту за молекулярними маркерами генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* хмелю звичайного.

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

Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* (довжини продуктів ампліфікації певних регіонів генів у парах нуклеотидів, п.н.) у вибірці досліджуваних сортів наведено у таблиці.

Поліморфізм генів, що кодують халконсинтази, у сортів хмелю звичайного української селекції [6, 12]

Сорт	Локус							
	3'-не- трансльова- ний регіон гена <i>chs_H1</i>	інтрон 1 гена <i>chs_H1</i>	екзон 2 гена <i>chs_H1</i>	інтрон гена <i>chs2</i>	інтрон гена <i>chs3</i>	інтрон гена <i>chs4</i>	Промотор гена <i>vps</i>	екзон 1, інтрон. екзон 2 гена <i>vps</i>
	Довжина локусу, п.н.							
Альта	247, 267	248, 264	1833, 1833	230, 240	232, 232	223, 223	188, 188	917, 1303
Промінь	255, 267	248, 264	1833, 1833	230, 230	232, 232	223, 223	188, 188	917, 1303
Заграва	255, 267	264, 264	1833, 1833	237, 237	232, 232	223, 223	178, 185	1303, 1303
Видибор	255, 267	248, 248	1833, 1833	237, 237	232, 232	223, 223	178, 185	1303, 1303
Гайдамацький	261,267,267	248,264,272	1833,1833,1833	237,237,237	232,232,232	223,223,223	175,178,185	1303,1303, 1303
Назарій	261, 267	248, 264	1833, 1833	230, 240	232, 232	223, 223	180, 180	917, 1303
Надія	261, 267	248, 264	1833, 1833	230, 230	232, 232	223, 223	180, 180	1303, 1303
Поліський	261, 267	253, 253	1833, 1833	230, 240	232, 232	223, 223	180, 180	1303, 1303
Полісянка	261, 267	264, 264	1833, 1833	237, 237	232, 232	223, 223	178, 185	1303, 1303
Оскар	261, 267	248, 264	1833, 1833	237, 237	232, 232	223, 223	178, 185	1303, 1303
Пивовар	247, 267	264, 272	1833, 1833	237, 237	232, 232	223, 223	178, 185	1303, 1303
Клон 18	261, 267	264, 272	1833, 1833	237, 237	232, 232	223, 223	165, 175	1303, 1303
Оболонський	261, 267	264, 272	1833, 1833	230, 240	232, 232	223, 223	180, 180	1303, 1303
Славянка	261, 267	264, 272	1833, 1833	237, 237	232, 232	223, 223	175, 185	1303, 1303
Хмелеслав	247, 267	248, 264	1833, 1833	230, 230	232, 232	223, 223	175, 185	1303, 1303
Кумир	261, 267	248, 264	1833, 1833	230, 230	232, 232	223, 223	191, 191	917, 1303
Чаклун	247, 267	248, 264	1833, 1833	230, 240	232, 232	223, 223	180, 180	1303, 1303
Ксанта	255, 267	264, 272	1833, 1833	230, 230	232, 232	223, 223	180, 180	1303, 1303
Житомирський 75	247, 267	234, 234	2015, 2015	237, 237	232, 232	223, 223	178, 185	1303, 1303
Зміна	255, 267	264, 272	1833, 1833	230, 240	232, 232	223, 223	180, 180	1303, 1303

Кластерний аналіз даних молекулярно-генетичного аналізу проводили за допомогою програми TREES 4.0 (у вільному доступі) незваженим парногруповим методом з арифметичним усередненням (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) [5].

Достовірність перевіряли за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Спірмана [10] для малих вибірок.

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

Кластерний аналіз даних молекулярно-генетичних досліджень поліморфізму окремих регіонів генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4*, *vps* та поліморфізму окремих генів, а також їх поєднань не дозволив згрупувати сорти за типом (дендрограми не наведено).

За результатами кластерного аналізу сумарних даних щодо поліморфізму генів, які кодують халконсинтази, отримано угруповання сортів за типом. На дендрограмі визначено два кластери: до кластеру I увійшли всі гіркі сорти, до кластеру II – всі ароматичні (рисунок).

Значення критичної точки $T_{кр}$ становить 0,19, коефіцієнта – 0,88. $|r| > T_{кр}$ ($0,88 > 0,19$), це означає, що нульова гіпотеза не підтверджується; ранговий кореляційний зв'язок між ознаками значущий. Довірчий інтервал r був (0,79; 0,97). Таким чином, зв'язок між показником «тип сорту» (гіркий або ароматичний) і поліморфізмом певних регіонів генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* хмелю звичайного є прямим, значущим та в межах довірчого інтервалу.

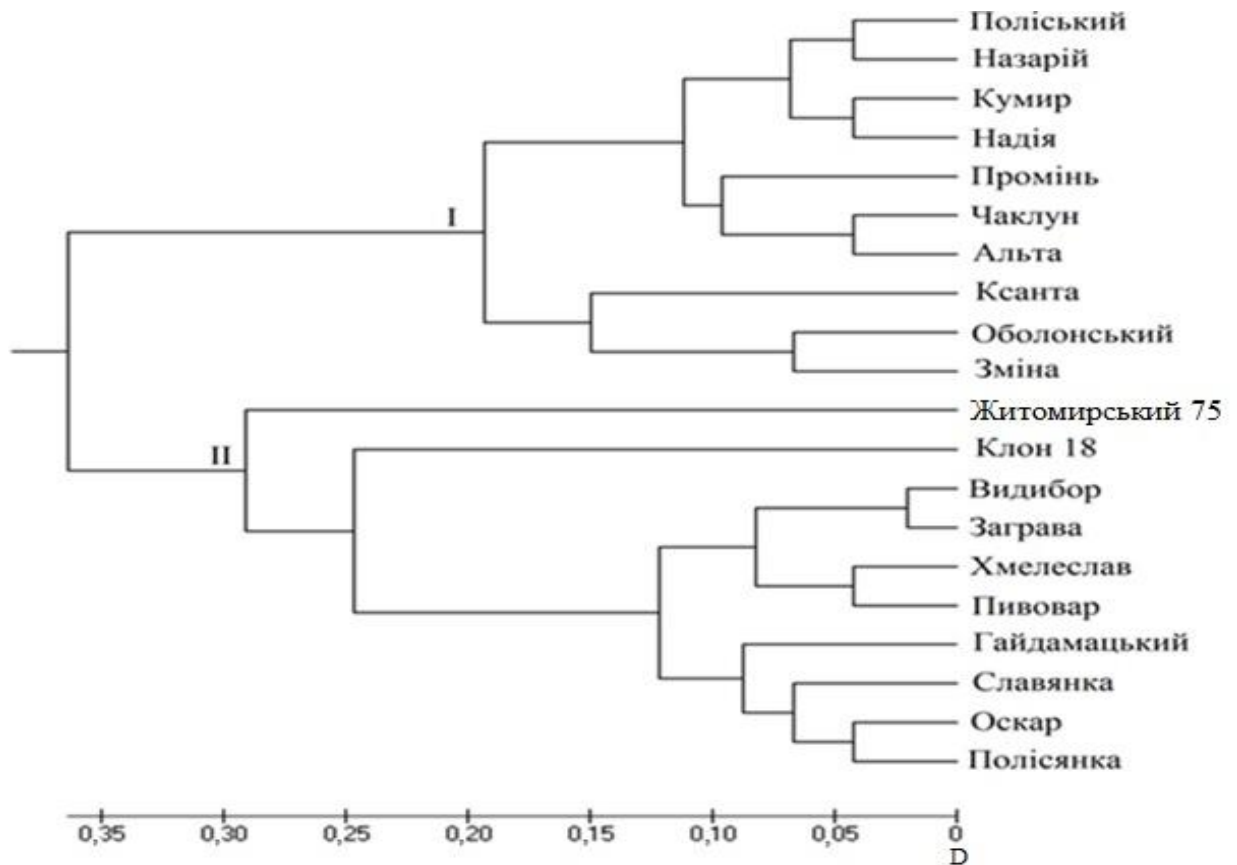


Рис. Результати кластерного аналізу поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* сортів хмелю звичайного української селекції (I і II – кластери)

Таким чином, кластеризація за типом здійснилась тільки за використання сумарних даних щодо поліморфізму всіх регіонів усіх досліджених генів. Це означає, що для синтезу певних кількостей когумулону, колупулону й отримання певного співвідношення β - і α -кислот, що призводить до формування показника «тип сорту», важливим є алельний стан усіх генів, що кодують халконсинтази, *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*. При цьому слід відзначити, що функції CHS3 невідомі, а функції CHS2 та CHS4 відомі тільки в умовах *in vitro* [8].

ВИСНОВКИ

1. Показана залежність типу сорту хмелю звичайного від поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*.

2. Розроблений статистично достовірний підхід оцінки типу сорту хмелю за молекулярними маркерами, який дозволяє зменшити часові та матеріальні витрати при ідентифікації генотипів хмелю звичайного.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses / [J. Patzak, V. Nesvadba, A. Henychova, K. Krofta] // Biochemical Systematics and Ecology. 2010. №38- P. 136–145.
2. Cloning and characterisation of chs-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.) / [J. Matousek, P. Novak, J. Patzak, H. Niedermeierova] // Plant Science. 2002. №162-P. 1007–1018.
3. 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, G. Leggett] // Ann Bot. 2008. № 102 (2).- P. 265–273.
4. Genbank Derived microsatellite markers in hop [N. Bassil, B. Gilmore, J. Oliphant, J. Henning] // Acta hort. 2005. № 668.- P. 47– 52.
5. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / [K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher et all] // Molecular Biology and Evolution. 2011. № 28 (10).- P. 2731-2739.
6. Venger A. Molecular-genetic polymorphism of *vps* gene in Ukrainian hop varieties / A. Venger, N. Volkova // Modern science. 2014. № 1.- P. 28-34.
7. 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. № 50.-P. 15– 25.
8. Schröder J. Stilbene and chalcone synthases: related enzymes with key functions in plant-specific pathways / J. Schröder, G. Schröder // Journal of biosciences. 1990. №45.- P. 5– 8.

9. Chadwick L. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties / L. R. Chadwick, G. F. Pauli, N. R. Farnsworth // *Phytomedicine*. 2006. №13.-P. 119–131.
10. Spearman C. The proof and measurement of association between two thing / C. Spearman // *Amer. J. Psychol.* 1987. № 100.- P. 441–471.
11. Ляшенко Н. И. Физиология и биохимия хмеля / , Н. Г. Михайлов, Р. И. Рудык / Житомир: Полісся, 2004. – 405 с.
12. Венгер А. М. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *chs2*, *chs3*, *chs4* у сортів хмеля звичайного української селекції / А. М. Венгер, Н. Е. Волкова // *Вісник Запорізького національного університету*. – 2014. – Т. 1. – 13-21 с.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ХАЛКОНСИНТАЗЫ, И ИХ СВЯЗЬ С УРОВНЕМ ГОРЬКИХ ВЕЩЕСТВ ШИШЕК ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

А. Н. Венгер, Н. Э. Волкова

Проведен анализ полиморфизма генов, кодирующих халконсинтазы у сортов хмеля украинской селекции. Показана зависимость между полиморфизмом данных генов и уровнем горьких веществ в составе шишек хмеля. Показана возможность использования молекулярных маркеров выявляющих полиморфизм генов, кодирующих халконсинтазы, для определения типа (горький или ароматический) сорта хмеля.

Ключевые слова: *хмель, халконсинтазы, полиморфизм, горькие и ароматические сорта, кластерный анализ.*

POLYMORPHISM OF CHALCONE SYNTHASE ENCODING GENES AND THEIR RELATION WITH BITTER SUBSTANCES LEVEL IN HOPS CONES

A. M. Venger, N. E. Volkova

Analysis of polymorphism of encoding chalcone synthase genes of Ukrainian hop varieties was conducted. The dependence between gene polymorphism and the level of bitter substances in hop cones was shown. The possibility of usage of molecular markers that show the polymorphisms of encoding chalcone synthase genes for determination of hop varieties type (aroma of bitter) was shown.

Key words: *hop, chalcone synthase, polymorphism, bitter and aromatic varieties, cluster analysis.*