

СЕЛЕКЦІЯ, НАСІННИЦТВО

УДК 633.522:631.52

DOI <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2025.31.25>

RAPD–ДІАГНОСТИКА СОРТІВ ЯЧМЕНЮ ВІТЧИЗНЯНОЇ ТА ЗАРУБІЖНОЇ СЕЛЕКЦІЇ

ВЕРЕЩАГІН І.В. – кандидат сільськогосподарських наук, доцент
orcid.org/0000-0002-6589-5138

Сумський національний аграрний університет

БЕРДІН С.І. – кандидат сільськогосподарських наук, доцент
orcid.org/0000-0002-2337-4107

Сумський національний аграрний університет

КОВАЛЕНКО В.М. – кандидат сільськогосподарських наук, доцент
orcid.org/0000-0002-9830-3370

Сумський національний аграрний університет

Постановка проблеми. Після кукурудзи, ячмінь є другою за величиною грубою зерною культурою, якою торгують у всьому світі. На долю основних виробників ячменю припадає близько 75% від загального світового виробництва [1].

Аналіз літературних даних показує значне розмаїття серед сортів ячменю за хімічним складом і морфологічними характеристиками, зокрема вміст білка варіював у діапазоні від 11,48% до 22,4%, що відображає важливі відмінності в якості зерна серед сортів, що включенні до програми досліджень. Так безості сорти ячменю характеризувалися 11,48–12,75% білку. Розмах варіювання визначеної ознаки у сорту Явір досягав до 16,2%, у колекційних зразків 18,9–22,4% [2, 3].

Дані сорти та зразки з високим вмістом білка можуть бути рекомендовані для використання в галузях, де білок відіграє ключову роль у технологічних процесах.

Основним методом створення нового вихідного матеріалу у селекції ячменю є гібридизація, родинно-груповий добір та штучний мутагенез із подальшим індивідуальним добором перспективних форм. Проте на сьогоднішній день спостерігається зниження генетичного різноманіття польових культур якраз саме через штучний добір, а також те, що біологічний потенціал господарських ознак наблизився до своєї межі (відбувається т. зв. "вихід на плато"). Тому одним із шляхів подолання даної проблеми є запровадження методів молекулярної діагностики у селекційну практику. Одним з таких методів є використання RAPD–праймерів (Random Amplified Polymorphic DNA) – олігонуклеотидних фрагментів ДНК, здатних виявляти поліморфні фрагменти у тих чи інших локусах. Молекулярні методи можуть напряму виявляти гени або групи генів, що відповідають за експресію ознак, на поліпшення яких проводиться селекція, що робить можливим здійснювати добори напряму без довготривалого оцінювання рослин за фенотипом у польових умовах [4, 5].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Існує цілий ряд публікацій, присвячених генетичному поліморфізму ячменю, діагностованому за допомогою ПЛР з використанням RAPD–праймерів.

Žvingila et al досліджували генетичну варіабельність мутантного гену *tw* (хімічний мутагенез), який відповідає

за зміну форми пиляків та щільність колосу. У дослідженні було використано 30 праймерів RAPD і з них виявлено високий ступінь поліморфізму – понад 85,7%. Автори дійшли висновку, що мутаген зачіпає декілька локусів, чим і пояснюється такий відсоток поліморфізму [6].

Velicevici G. зі співавторами досліджували поліморфізм 19 сортів ячменю озимого з метою подальшої селекції на поліпшення основних господарських ознак використовавши три декамерні RAPD–праймери. Ступінь поліморфізму за їх даними складав 100% по праймеру з нуклеотидною послідовністю CTGCATCGTG. Дослідники запропонували використовувати отримані результати для складання схем гібридизації з залученням досліджуваних сортів та створення банку зародкової плазми [7].

Al-Saffar R.S. провів дослідження генетичної відстані між 121 популяцією дикого ячменю з Іраку, Ірану та Туреччини. Для аналізу було використано 4 RAPD–праймери, які виявилися поліморфними з різним ступенем генетичної варіабельності. Автор наголошує на важливості генетичного профілювання диких генотипів ячменю через наявність генів стійкості до бурої листової іржі та залучення їх до селекційних програм, зокрема гібридизації.

Наступного року було проаналізовано 9 сортів іракського ячменю за допомогою методу RAPD. Дослідження виявило високий ступінь генетичної спорідненості між сортами, що пов'язано зі спільністю походження та умов культивування. Дані сорти рекомендовані в якості донорів генів цінних ознак для селекційної практики [8].

Румунські дослідники з University of Life Sciences „King Michael I” проводили дослідження генетичної подібності 6 геніторів (батьківських рослин з чоловічими гаметами) та 15 гібридів ячменю з використанням методу RAPD–маркерів. Встановлений високий ступінь поліморфізму досліджуваних форм та рекомендовано використовувати цей матеріал з метою підвищення генетичної різноманітності культури [9].

Cheghamirza K. з колегами використав в діагностиці 20 гібридів ячменю 31 RAPD–праймер, які пов'язані з кількістю біомаси, масою зерна з рослини та довжиною колоса. Встановлено, що деякі локуси пов'язані

з більше ніж однією ознакою і відмітили високу ступінь фенотипової мінливості [10].

Мета. Здійснити діагностику сортів ячменю вітчизняної та зарубіжної селекції за ознакою вмісту білка та ізоферментів методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням олігонуклеотидних RAPD-праймерів, встановити відсоток можливого поліморфізму фрагментів ДНК, що відповідають цільовим локусам та встановити спорідненість сортів за досліджуваними ознаками..

Матеріал і методика досліджень. В якості об'єкта досліджень виступали сорти ячменю вітчизняного та іноземного походження: Аграрій. (Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН), Богун (Інститут пшениці імені В. М. Ремесла НААН), Командор (Селекційно-генетичний інститут НААН), Акордіне (SAATEN Union, Німеччина). Виділення ДНК здійснювали комерційним набором (протокол лабораторії провідних біотехнологій Neogen).

Праймери, що використовувалися у роботі, належать до RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) і є декамерними (складаються з 10 основ). Вони мають таку послідовність: UBC-402 CCCGCCGTTG та UBC -475 CCAGCGTATT. Ці праймери ідентифікуються з генами експресії вмісту білку та ізоферментів у зерні ячменю [8].

Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 2% агарозному гелі в присутності бромистого етидію. В якості маркера молекулярної ваги використовували рUC19 DNA / Kzo91 виробництва Eurofins Genomics. Маркер являє собою плазмід, гідролізовану ферментом з утворенням 15 фрагментів та включає від 955 до 8 пар нуклеотидів.

Генетичну відстань між сортами визначали за допомогою програми "STATISTIKA 8.0".

Результати досліджень. Якісний результат полімеразної ланцюгової реакції неможливий без якісного препарату ДНК—він має бути максимально очищеним та цілісним. Оцінка стану препаратів ДНК сортів ячменю, здійснена за допомогою гель-електрофорезу, засвідчує високу якість препаратів нуклеїнових кислот, що підтверджують тонкі бенди (смужки).

За результатами полімеразної ланцюгової реакції нами встановлено локалізацію генів, що пов'язані з експресією ознак вмісту білка та ізоферментів у досліджуваних сортах ячменю. Як видно з рис. 1, найкраща роздільна здатність бендів спостерігається у сортів Акордіне, Командор, Богун по праймеру UBC-402 (угорі) та Акордіне та Богун по праймеру UBC-475 (внизу).

Також розподіл по довжині фрагментів ампліконів неоднаковий. По першому праймеру локуси сортів Акордіно та Аграрій мають довжину 341 н.п., Командор та Богун – 258 н.п. По другому праймеру локуси розміщено дещо іншим чином: Акордіно, Командор та Богун – 258 н.п., Аграрій – 341 н.п.

Кожен RAPD-праймер, як правило, визначає ампліфікацію послідовностей з кількох локусів геному, тому

цей метод є ефективним засобом оцінки поліморфізму ДНК у різних генотипів ячменю. Результати наших досліджень виявили, що кожному цільовому локусу компліментарно відповідає один декамерний праймер. Поліморфні фрагменти відсутні взагалі. Ще однією спільною рисою досліджуваних сортів ячменю є майже однакова довжина ампліфікованих фрагментів ДНК (таблиця 1).

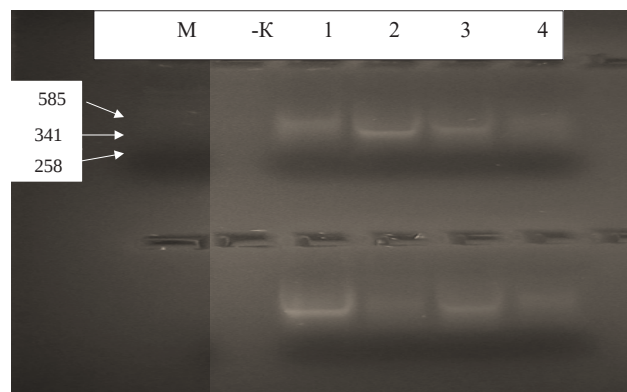


Рис. 1. Результати полімеразної ланцюгової реакції сортів ячменю з використанням праймерів UBC-402 та UBC-475: 1–Акордіне, 2–Командор, 3–Богун, 4–Аграрій

Надзвичайно важливим фактом стало те, що використані праймери виявилися надзвичайно специфічними для даного матеріалу. Відсутність генетичного поліморфізму, з одного боку, дещо ускладнює проведення селекційної роботи на якісний склад борошна ячменю, проте чітко вказуються цільові гени, що відповідають за експресію цієї ознаки.

Для визначення генетичної відстані між сортами ячменю ми визначили головним фактором локалізацію ампліконів у фрагментах відповідної довжини. Фрагмент 341 н.п. визначено як 2, а 258 н.п. як 1.

Таблиця 1

Довжина ампліфікованих фрагментів ДНК ячменю

Праймер	Нуклеотидна послідовність	Кількість фрагментів	Розмір фрагментів, н.п.
UBC-402	CCCGCCGTTG	4	258–341 (50% відповідно)
UBC-475	CCAGCGTATT	4	258–341 (75% і 25% відповідно)

Для визначення генетичної відстані між сортами ячменю ми визначили головним фактором локалізацію ампліконів у фрагментах відповідної довжини. Фрагмент 341 н.п. визначено як 2, а 258 н.п. як 1.

За результатами кластерного аналізу утворено чотири окремі кластери, що свідчать про відсутність спорідненості між досліджуваними сортами ячменю за використаними праймерами (рис. 2).

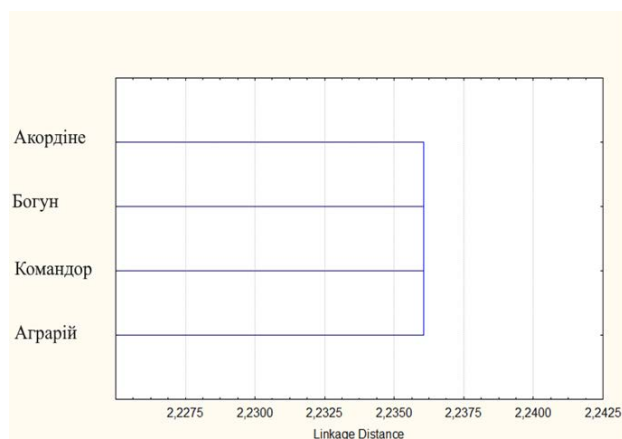


Рис. 2. Результати кластерного аналізу сортів ячменю за ступенем спорідненості

Висновки. Проведені дослідження засвідчують відсутність поліморфних фрагментів ДНК ячменю за двома RAPD–праймерами, натомість вказують наявність локусів цільових генів, що відповідають за експресію ознак вмісту білку та ізоферментів.

Послідовність фрагментів визначається компліментарно послідовності праймера: GGGCGGCAAC та GGTGCGATAA. Також вважаємо, що необхідно проводити дослідження поліморфізму сортів ячменю з використанням 10–20 праймерів RAPD, а також праймерів ISSR.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Hang A., Burton C.S., Satterfield K. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis in Barley Plants Derived from Anther Culture. *Cytologia*. 1997. V. 62. pp. 377–382.
2. Guetteche H., Jarrar A.A., Khiyel I., Djekkoun N., Rouabah L., Rouabah A., Benbelkacem A., Nick P. The popular Algerian barley landraces Saïda and Tichedrett are autochthonous—evidence from RAPD, SSR and agrophenological markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 2023. 20. pp. 394–405. <https://doi.org/10.1017/S1479262123000291>
3. Kroth M.A., Ramella M.S., Tagliari C., de Francisco A., Arisi A.C.M. Genetic Similarity of Brazilian Hull-Less and Malting Barley Varieties Evaluated by RAPD Markers. *Scientia Agrícola*. 2006. 62 (1). pp. 36–39.
4. Fadel A.A., Abdulhamed Z.A., Yousif S.A. RAPD Technique to Determine the Genetic Divergence of Barley Genotypes. IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*, May 18–22, 2022, Monreal, Canada, 2022. P. 1–13. doi:10.1088/1755-1315/1060/1/012123
5. Сиволап Ю.М. Геном рослин і "молекулярна селекція". *Селекція і насінництво*. 2008. Вип. 96. С. 34–42. DOI: <https://doi.org/10.30835/2413-7510.2008.77191>
6. Žvingila D., Vaitkūnienė V., Patamsytė J., Leistrumaitė A., Staniūtė M., Balčiūnienė L., Česnienė T., Kleizaitė V., Šiukšta R., Rancelis V. DNA polymorphism and agronomic traits of revertants from barley (*Hordeum vulgare* L.) mutant tw. *Žemdirbystė. Agriculture*. 2012. V. 2 (99). pp. 139–148.
7. Velicevici G., Madoșă E., Ciulca S., Petolescu C., Lazar A., Malaescu M., Coradini R., Cretescu I.

Genetic diversity of barley (*Hordeum Vulgare*.) using random amplified polymorphic DNA markers (RAPD). *Researchers and current tasks in multidisciplinary sciences: proceedings of the scientific conference*, June 12–16, 2013, Lozenets, Bulgaria, 2013. P. 266 – 270.

8. Al-Saffar R.S. Analysis of the Genetic Distance of Several Generations of Barley (*Hordeum vulgare* L.) by RAPD–PCR Technique. *Revis Bionatura*. 2023. 8 (1). pp. 1–4. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.01.23>
9. Ciulca A., Madoșă E., Velicevici G., Popescu S., Sărac I., Ciulca S. Genetic Diversity in a Half-Diallel Population of Barley Based on RAPD Analysis. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 2022. 26(4). pp. 132–138.
10. Cheghamirza K., Zarei L., Zebarjadi A.R., Honarmand S.J. A study of the association between ISSR and RAPD markers and some agronomic traits in barley using a multiple regression analysis. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*. 2017. 98(1). pp. 33–40.

REFERENCES:

1. Hang, A., Burton, C. S., & Satterfield, K. (1997). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis in Barley Plants Derived from Anther Culture. *Cytologia*, 62, 377–382.
2. Guetteche, H., Jarrar, A. A., Khiyel, I., Djekkoun, N., Rouabah, L., Rouabah, A., Benbelkacem, A., & Nick, P. (2023). The popular Algerian barley landraces Saïda and Tichedrett are autochthonous—evidence from RAPD, SSR and agrophenological markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 20, 394–405.
3. Kroth, M. A., Ramella, M. S., Tagliari, C., Francisco, A. D., & Arisi, A. C. M. (2005). Genetic similarity of Brazilian hull-less and malting barley varieties evaluated by RAPD markers. *Scientia Agrícola*, 62, 36–39.
4. Fadel, A. A., Abdulhamed, Z. A., & Yousif, H. A. (2022). RAPD technique to determine the genetic divergence of barley genotypes IOP. In *Conf. Seri.: Earth Environ. Sci*, 761, 012077.
5. Syvolap, Yu.M. (2008). *Геном рослин і "молекулярна селекція"*. [The plant genome and "molecular breeding"]. *Breeding and seed production*, 96, 34–42.
6. Žvingila, D., Vaitkūnienė, V., Patamsytė, J., Leistrumaitė, A., Staniūtė, M., Balčiūnienė, L., ... & Rancelis, V. (2012). DNA polymorphism and agronomic traits of revertants from barley (*Hordeum vulgare* L.) mutant tw. *Agriculture*, 2 (99), 139–148.
7. Giancarla, V., Madoșă, E., Ciulca, S., Petolescu, C., Lazar, A., Malaescu, M., ... & Cretescu, I. (2013). Genetic diversity in barley (*Hordeum vulgare*.) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, 266 – 270.
8. Al-Saffar, R. S. (2023) Analysis of the Genetic Distance of Several Generations of Barley (*Hordeum vulgare* L.) by RAPD–PCR Technique. *Revis Bionatura*, 8 (1), 1–4.
9. Adriana, C., Madosa, E., Giancarla, V., Sorina, P., Sarac, I., & Ciulca, S. (2022). Genetic diversity in a half-diallel population of barley based on RAPD analysis. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 26(4), 132–138.
10. Cheghamirza, K., Zarei, L., Zebarjadi, A. R., & Honarmand, S. J. (2017). A study of the association

between ISSR and RAPD markers and some agronomic traits in barley using a multiple regression analysis. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 98(1), 33–40.

Верещагін І.В., Бердін С.І., Коваленко В.М. RAPD-діагностика сортів ячменю вітчизняної та зарубіжної селекції

Мета. Здійснити діагностику сортів ячменю вітчизняної та зарубіжної селекції за ознакою вмісту білка та ізоферментів методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням олігонуклеотидних RAPD-праймерів, встановити відсоток можливого поліморфізму фрагментів ДНК, що відповідають цільовим локусам та встановити спорідненість сортів за досліджуваними ознаками.

Методи. Матеріал досліджень складали сорти ячменю вітчизняної та зарубіжної селекції Акордіне, Командор, Богун, Аграрій. ДНК сортів виділяли з тінювих проростків твердофазним методом (фіксація ДНК на магнітному сорбенті). Ампліфікацію ДНК здійснювали ампліфікатором Bio-Rad C100 з використанням праймерів UBC-402 та UBC-475 та подальшою детекцією в агарозному гелі. **Результати.** Оцінка стану препаратів ДНК сортів ячменю, здійснена за допомогою гель-електрофорезу, засвідчує високу якість препаратів нуклеїнових кислот, що підтверджують тонкі бенди (смужки). За результатами полімеразної ланцюгової реакції нами встановлено локалізацію генів, що пов'язані з експресією ознак вмісту білка та ізоферментів у досліджуваних сортів ячменю. По першому праймеру локуси сортів Аккордіно та Аграрій мають довжину 341 н.п., Командор та Богун – 258 н.п. По другому праймеру локуси розміщено дещо іншим чином: Аккордіно, Командор та Богун – 258 н.п., Аграрій – 341 н.п. Результати наших досліджень виявили, що кожному цільовому локусу компліментарно відповідає один декамерний праймер. Поліморфні фрагменти відсутні взагалі. Ще однією спільною рисою досліджуваних сортів ячменю є майже однакова довжина ампліфікованих фрагментів ДНК. За результатами кластерного аналізу утворено чотири окремі кластери, що свідчать про відсутність спорідненості між досліджуваними сортами ячменю за використаними праймерами. **Висновки.** Наші дослідження засвідчують наявність поліморфних фрагментів ДНК ячменю за двома RAPD-праймерами, натомість показують наявність локусів цільових генів, що відповідають за експресію вмісту білка та ізоферментів. Послідовність фрагментів серії компліментарних комплексів праймера: GGGCGGCAAC та GGTCGCATAA. Також вважаємо, що необхідно проводити дослідження поліморфізму

сортів ячменю з використанням 10–20 праймерів RAPD, а також праймерів ISSR.

Ключові слова: ДНК, праймер, полімеразна ланцюгова реакція, локус, кластер.

Vereshchahin I.V., Berdin S.I., Kovalenko V.M. RAPD diagnostics of barley varieties of domestic and foreign selection

Purpose. To diagnose barley varieties of domestic and foreign selection based on protein content and isoenzymes by polymerase chain reaction using oligonucleotide RAPD primers, to establish the percentage of possible polymorphism of DNA fragments corresponding to target loci and to establish the relationship of varieties according to the studied traits. **Methods.** The research material consisted of barley varieties of domestic and foreign selection Accordine, Komandor, Bohun, Agrariy. DNA of the varieties was isolated from shade seedlings by the solid-phase method (DNA fixation on a magnetic sorbent). DNA amplification was carried out with a Bio-Rad C100 amplifier using primers UBC-402 and UBC-475 and subsequent detection in an agarose gel. **Results.** Assessment of the state of DNA preparations of barley varieties, carried out using gel electrophoresis, indicates the high quality of nucleic acid preparations, which is confirmed by thin bands (stripes). According to the results of polymerase chain reaction, we established the localization of genes associated with the expression of protein content traits and isoenzymes in the studied barley varieties. According to the first primer, the loci of the varieties Accordino and Agrariy have a length of 341 np, Komandor and Bohun – 258 np. According to the second primer, the loci are located in a slightly different way: Accordino, Komandor and Bohun – 258 np, Agrariy – 341 np. The results of our studies revealed that each target locus is complementary to one dekamer primer. Polymorphic fragments are absent at all. Another common feature of the studied barley varieties is the almost identical length of amplified DNA fragments. According to the results of cluster analysis, four separate clusters were formed, indicating the absence of kinship between the studied barley varieties according to the primers used. **Conclusions.** Our studies confirm the presence of polymorphic fragments of barley DNA according to two RAPD primers, but instead show the presence of loci of target genes responsible for the expression of protein content and isoenzymes. The sequence of fragments of a series of complementary primer complexes: GGGCGGCAAC and GGTCGCATAA. We also believe that it is necessary to conduct studies of the polymorphism of barley varieties using 10–20 RAPD primers, as well as ISSR primers.

Key words: DNA, primer, polymerase chain reaction, locus, cluster.