

**ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ХРОМОСОМИ 5Н ЯЧМЕНЮ  
(*HORDEUM VULGARE* L.) І АСОЦІАЦІЇ АЛЕЛІВ З МОРОЗОСТІЙКІСТЮ**

**М. Бальвінська, С. Гаврилов, В. Файт**

*Селекційно-генетичний інститут –  
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення  
Овідіопольська дорога, 3, Одеса 65065, Україна  
e-mail: faygen@ukr.net*

Ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) – культура, яка має велике економічне значення для багатьох країн світу, в тому числі і для України. Одним із основних факторів, що обмежує виробництво ячменю в різних регіонах України, вважається низькотемпературний стрес. Прогнозування морозостійкості під час створення та добору стійких генотипів є одним із головних завдань селекції. Використання молекулярно-генетичних інструментів аналізу передбачає підвищення ефективності традиційних методів ідентифікації та добору генотипів із необхідними ознаками у конкретній кліматичній зоні.

Локуси 5Н хромосоми є складовою частиною комплексної системи генів, що беруть участь у формуванні стійкості до низьких негативних температур. Досліджено поліморфізм і розподіл алелів 9 мікросателітних локусів хромосоми 5Н, які містяться в області ключових генів НТ-стійкості *Fr-H1*, *Fr-H2* та близько до цих регіонів у 35 сортів колекції ячменю осіннього строку посіву. На дослідженій вибірці сортів за локусами *Vmag 0223*, *Vmag0323*, *Vmag0760*, *GMS061* та *UMB702* детектовано алельний поліморфізм із наявністю від 2 (*UMB702*) до 5 (*Vmag 0223*) алелів. Проведено оцінку морозостійкості 31 сорту за різної тривалості загартування та відмічено суттєві відмінності між ними за даною ознакою. За результатами аналізу поліморфізму мікросателітних локусів і даних оцінки сортів за морозостійкістю виявлено зв'язок алельних відмінностей чотирьох із п'яти поліморфних локусів з рівнем морозостійкості й темпами загартування. Встановлено достовірні асоціації між наявністю алелів *Vmag0223*, *Vmag0323*, *Vmag0760*, *GMS061* та показниками рівня морозостійкості. Алельні відмінності за локусом *UMB702* не були асоційовані з відмінностями з жодною з ознак. Алелі мікросателітного локусу *Vmag0223* рекомендується використовувати під час негативного добору менш морозостійких генотипів на ранніх етапах селекції.

*Ключові слова:* ячмінь, ПЛР-аналіз, мікросателіти, ДНК-маркери, морозостійкість

Ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) є господарсько-цінним видом, який має велике економічне значення для світового виробництва зерна, зокрема, для України. Втрата генетичного різноманіття багатьох сільськогосподарських рослин, зокрема, ячменю, призводить до того, що вони стають дедалі більш сприйнятливими до різних екологічних стресів, у тому числі й у зв'язку з глобальною зміною клімату [12, 13, 30]. Останніми роками в усьому світі, в тому числі в Україні, відзначають велику амплітуду температур, зокрема, в зимовий і весняний періоди, від високих до низьких, аномальні умови з різкими перепадами температур і нестачею снігового покриву [4]. Серед стресових чинників, які

впливають на агрономічну цінність і обмежують урожайність ячменю, зокрема, осіннього строку сівби, особливе навантаження на рослини чинить низька від'ємна температура та пов'язані з нею ускладнення. Прогнозовані, але неконтрольовані несприятливі природні умови на тлі дії низьких від'ємних температур спонукають до пошуку нових, стійких до цих умов генотипів ячменю [3, 4].

Наразі вчені-селекціонери створили багато цінних високоврожайних сортів [5], однак їхня продуктивність під впливом несприятливої низької температури може значно варіювати по роках залежно від погодних умов [22], тому прогнозування морозостійкості залишається одним із головних завдань селекції не тільки у зонах Лісостепу й Полісся, але і в південних регіонах України [2, 3, 5]. Добір за даною ознакою в умовах польових випробувань не завжди є ефективним через недостатнє стресове навантаження або повну його відсутність у більшості років вирощування. Проблему морозостійкості ячменю осіннього строку сівби ускладнює також використання у виробництві як генотипів з типово озимим типом розвитку, так і дворучок (альтернативного чи факультативного типу розвитку), що мають інші фізіологічні механізми її формування. У типово озимого ячменю ця властивість пов'язана з тривалістю стадії яровизації, у дворучок – насамперед із реакцією на тривалість дня [7, 15].

Морозостійкість зернових культур триби *Triticeae*, до якої належить і ячмінь, як відомо, є складною кількісною ознакою і залишається предметом масштабних досліджень, зокрема, встановлення молекулярно- та фізіолого-генетичних особливостей, що тривають уже кілька десятиліть [9, 17, 24, 28]. Наразі відомо, що головними генетичними детермінантами стійкості до низьких температур у ячменю є локуси *Fr-H1* і *Fr-H2* хромосоми 5Н [14, 15, 25, 26]. Довжина ефективної дії головного QTL-5НL ячменю, який відповідальний за стійкість до впливу негативних температур, становить, за різними дослідженнями, 21–30 сМ [20]. Цей QTL відповідає областям 5Н-bin11 та 5Н-bin9-10 ключових генів морозостійкості *Fr-H1* та *Fr-H2*, відповідно [20], що обумовлює 36,6 і 21,5 % фенотипічної мінливості щодо зимостійкості ячменю, 30,6 і 30,7 % морозостійкості, оціненої у контрольованих лабораторних умовах, та 45,3 і 46,8 % варіабельності морозостійкості, виміряної за значенням параметра флуоресценції хлорофілу (Fv/Fm), і було встановлено дослідниками на початку 2000-х років [26]. Пізніше ідентифіковано ще три QTLs на хромосомах 1НL (*Fr-H3*), 4НS і 4НL, оцінка ефектів яких і частка вкладу у фенотипове різноманіття поки що до кінця не визначені [16].

Традиційна селекція сортів, зокрема, ячменю, є складним і тривалим процесом, а це, у свою чергу, призводить до необхідності залучати сучасні допоміжні інструменти, які прискорюють оцінку та добір потрібних генотипів [6]. Результати досліджень світового рівня визначають використання ДНК-маркерів, у тому числі на основі аналізу мікросателітних локусів, ефективним і зручним підходом для оцінки стійкості генотипів, зокрема, ячменю, до дії низьких температур та інших абіотичних стресів [18, 21]. Такі мікросателітні маркери рекомендовано для MAS [10, 19, 23, 26]. Використання молекулярно-генетичних методів аналізу передбачає підвищення ефективності ідентифікації та добору генотипів з необхідними ознаками для використання їх у селекційних програмах у конкретній кліматичній зоні.

Мета даної роботи – дослідити поліморфізм мікросателітних локусів 5Н хромосоми для одержання потенційних ДНК-маркерів, що дадуть змогу визначати генотипи ячменю з ознаками стійкості до несприятливих умов, спричинених низькими від'ємними температурами, та проводити за необхідності їхній добір.

### Матеріали та методи

Як вихідний матеріал використовували 35 сортів ячменю озимого й альтернативного (дворучки) типу розвитку різного походження. Серед вивчених – 17 сортів (Абориген, Айвенго, Академічний, Валькірія, Дев'ятий Вал, Достойний, Зимран, Манас, Метелиця, Одеський 170, Одеський 46, Оксамит, Роман, Росава, Селена Стар, Снігова Королева, Трудівник) вітчизняної селекції, зокрема, СГІ-НЦНС, 18 – інших оригінаторів, у тому числі 17 європейських: 12 східноєвропейських (Державний, Еспада, Жаворонок, Кондрат, Кумач, Метакса, Михайло, Платон, Путнік, Тігр, Тимофей, Хуторок), 3 центральноєвропейських (Luran, Sinderella, Maubrit), 2 західноєвропейських (Gerlach, Scarpia) та 1 євразійського (Roho). Серед дослідженої вибірки – 25 типowo озимих, решта 10 (Абориген, Айвенго, Валькірія, Дев'ятий Вал, Достойний, Снігова Королева, Одеський 46, Росава, Путнік, Тимофей) заявлені як сорти-дворучки.

ДНК виділяли з 3 індивідуальних рослин кожного сорту (паростків, листя) за допомогою ЦТАБ-буфера [6, 8]. Зразки виділеної ДНК (суміші, створені з індивідуальних рослин) досліджували шляхом ПЛР-аналізу.

ПЛР-ампліфікацію проводили на термоциклері T100™ «Bio-Rad» (США). Реакційна суміш для проведення ПЛР мала такий склад: 1хПЛР-буфер для *Taq*-полімерази (50 мМ KCl, 20 мМ Tris-HCl, рН 8,4 (25 °C), 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Tween-20), 0,2 мМ кожного з дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфатів), 0,25 мкМ кожного з праймерів. Суміш об'ємом 10 мкл містила 50 нг ДНК і 0,2 одиниці *Taq*-полімерази.

Для проведення ПЛР використали специфічні праймери до мікросателітних локусів Bmag 0223, Bmag0323, Bmag0760, GMS061, UMB702, GBM1166, GBM1227, Bmag0113a та Bmag812 [11, 19].

Умови ПЛР-ампліфікації для мікросателітних локусів [1, 6]: 45 циклів; початкова денатурація: 94 °C – 3 хв, далі усі цикли 94 °C – 1 хв; відпал: 55 °C – 1 хв, елонгація: 72 °C – 2 хв. Заклучна елонгація: 72 °C – 5 хв.

Продукти реакції ампліфікації фракціонували методом електрофорезу згідно з [1, 6].

Документування профілів ДНК та їхню обробку проводили за допомогою цифрової мінікамери «Samsung» і комп'ютерного програмного забезпечення відповідно.

Стійкість до морозу у рослин ячменю визначали в лабораторних умовах на стадії паростків рулонним методом у модифікації відділу стійкості до абіотичних факторів СГІ-НЦНС. Оскільки паросткам, одержаним з насіння різних регіонів або різних років, властива різна стійкість до стресорів, то для оцінки морозостійкості використовували паростки з насіння 31 сорту, що були репродуковані нами в умовах Одеси у 2018 р.

Перед проморожуванням рослини ячменю проходили загартування за скороченої тривалості дня (10 год) протягом 15 або 30 діб за температури 2,5 °C. Загартування упродовж 30 діб за наведених вище температурно-світлових умов є достатнім для формування у генотипів типowo озимого ячменю та дворучок статичної морозостійкості, яка достатньою мірою збігається з результатами польових досліджень. Для визначення показників морозостійкості й темпів загартування рослини ячменю проморожували за -9 °C з експозицією тесту 24 год. Критерієм морозостійкості слугувала наявність (%) живих рослин після проморожування. Темпи загартування визначали як відношення морозостійкості дослідних зразків після 15 діб загартування до статичної морозостійкості після 30 діб загартування у відсотках. Випробування проводили у 3-кратній повторності.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали з використанням пакету програм «Аналіз даних» Microsoft Excel.

**Результати і їхнє обговорення**

З літературних джерел відомо про низку мікросателітних маркерів, що запропоновані для оцінки стійкості рослин до абіотичних стресів, зокрема, низькотемпературного [11, 59], як у лабораторних умовах, так і з метою застосування в маркерній селекції (MAS).

Проведено мікросателітний аналіз вибірки з 35 генотипів ячменю з маркерами хромосоми 5Н, а саме Vmag0223, Vmag0323, Vmag0760, GBM1166, GBM1227, GMS061, UMB702 та Vmag0113a та Vmag812, які перебувають у зоні генів морозостійкості *Fr-H1* і *Fr-H2* та близько до них.

Алельна характеристика досліджених локусів хромосоми 5Н та розподіл алелів

За результатами аналізу 9 мікросателітних локусів хромосоми 5Н, у дослідженій вибірці сортів ячменю озимого й альтернативного типу розвитку детектовано загалом 21 алельний варіант (табл. 1).

Таблиця 1

Алелі та варіабельність мікросателітних локусів хромосоми 5Н

Локус	Кількість алелів	Розмір, п. н.	Частота, %	PIС <sup>1</sup>
Vmag0223	5	127	17,6±6,53	0,77
		150	32,4±8,03	
		160	23,6±7,28	
		170	17,6±6,53	
		180	8,8±4,86	
Vmag0323	4	148	11,4±5,37	0,52
		155	7,1±4,34	
		160	65,8±8,02	
		165	15,7±6,15	
Vmag0760	3	105	11,4±5,37	0,41
		110	74,3±4,34	
		н.а	14,3±5,92	
GMS061	3	135	20,0±6,76	0,64
		140	42,9±8,37	
UMB702	2	145	37,1±8,17	0,28
		н.а	17,1±6,36	
GBM1166	1	280	82,9±6,36	0
		165	100,0	
GBM1227	1	210	100,0	0
Vmag0113a	1	153	100,0	0
Vmag812	1	190	100,0	0

**Примітки:** <sup>1</sup>PIС (Polymorphic Index Content) – індекс поліморфності мікросателітного локусу

Діапазон розмірів детектованих алелів досліджених мікросателітних ділянок, а також середня кількість алелів на один локус, що становить 2,3 алеля, співвідносяться з даними літературних джерел [6, 11, 27]. За локусами Vmag0760, GMS061, UMB702, Vmag0323 та Vmag0223 виявлено від 2 до 5 алелів. Інші 4 локуси GBM1166, GBM1227, Vmag812, Vmag0113a виявилися мономорфними і мали тільки один специфічний ПЛР-продукт. Відсутність алельного поліморфізму за локусом Vmag812 у вивчених сортів ячменю була несподіваною, враховуючи результати попередніх досліджень щодо кількості алелів та індексу поліморфності для даного локусу. Так, за даними різних авторів, у локусі Vmag812 можна виявити від 2 до 7 алелів, і його рекомендують для використання в MAS

на морозостійкість [11, 19]. Мікросателітний локус Vmag812 (5H-bin9, регіон Fr-H2) демонструє високу генетичну мінливість із показником PIC 0,77 серед 28 2-рядних і 6-рядних сортів озимого ячменю різного походження, досліджених М. Raracz зі співавторами [19]. Водночас автори не уточнюють, наявність яких саме алелів цього локусу діагностує стійкість або чутливість до морозу серед генотипів ячменю.

Значення індексу поліморфності (PIC) досліджених мікросателітних локусів, які обчислено на основі частот алелів, варіювали для поліморфних мікросателітів у межах 0,28-0,77 (табл. 1). Найвищий індекс поліморфності (0,77) спостерігали за локусом Vmag0223. Найнижче значення цього показника (0,28) виявили за локусом UMB702. Середнє значення PIC становило 0,52. Невелике середнє значення цього показника може свідчити про помірне алельне різноманіття досліджених МС-локусів, наявність одного з алельних варіантів зі значною частотою, яка істотно перевищує частоту інших алелів.

Найбільш варіабельним для даної вибірки генотипів ячменю є локус Vmag0223, за яким детектовано 5 алельних варіантів 127, 150, 160, 170 та 180 п. н. (табл. 1). Розподіл алелів локусу Vmag0223 був більш-менш рівномірним (рис. 1).

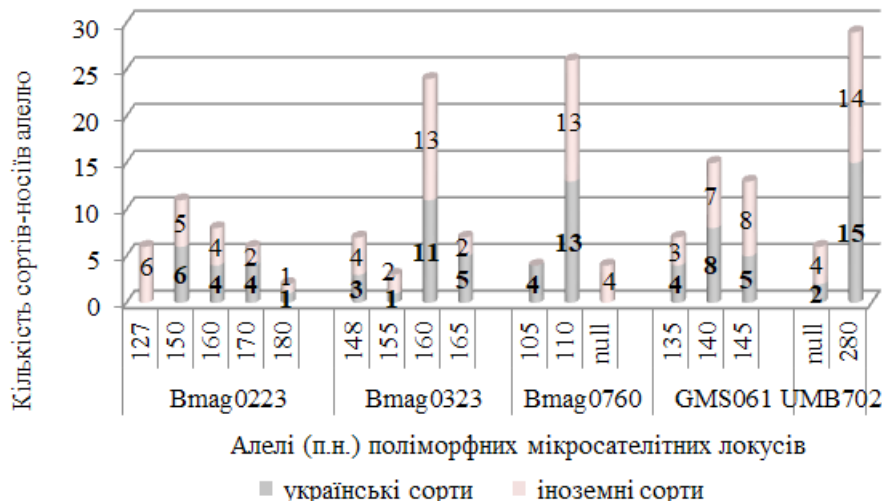


Рис. 1. Розподіл алелів мікросателітних локусів серед досліджених сортів ячменю

Достовірні відмінності виявлено лише між більш поширеним алелем 150 п. н., що траплявся з частотою  $32,4 \pm 8,03\%$ , та найменш поширеним – 180 п. н. ( $8,8 \pm 4,86\%$ ) ( $t_{\text{фактичне}} = 2,51$  при  $t_{0,05} = 2,14$ ). Інші алелі за частотою між собою істотно не відрізнялися ( $d < S_d \times t_{0,05}$ ). Більшість алелів цього локусу наявні у сортів ячменю із різних місцевостей, але алель 127 п. н. виявлено тільки у 6 генотипів (Еспада, Кондрат, Михайло, Спутник, Тигр, Хуторок) східноєвропейського походження (рис. 1). Це, ймовірно, може свідчити як про генетичну схожість вихідних генотипів, залучених до селекції під час створення цих сортів, так і про збереження у процесі добору саме генотипів-носіїв алельного варіанта 127 п. н., який потенційно може бути пов'язаний із проявом ознак, кращих або необхідних для певних зон вирощування чи для конкретної місцевості.

Аналогічний розподіл алелів спостерігали і за локусом GMS061, у якого відмічали наявність 3 алелів (табл. 1). Як і в попередньому випадку, істотні відмінності виявлено тільки між більш поширеним алелем 140 п. н. ( $42,9 \pm 8,37\%$ ) і менш поширеним 135 п. н. ( $20,0 \pm 6,76\%$ ) ( $t_{\text{фактичне}} = 2,13$  при  $t_{0,05} = 2,07$ ). При цьому останній алель детектовано як

у сортів вітчизняної селекції, так і у сортів іншого походження (рис.1), але його немає в генотипі 5 європейських сортів – 2 із Заходу (Gerlach, Scargia) та 3 із Центру Європи (Luran, Sinderella, Maubrit). Алель 145 п. н. локусу GMS061 виявлено у 13 сортів різного походження. Він достовірно не відрізнявся за частотою від 2 інших алелів.

За наступними 3 локусами Vmag0323, Vmag0760 та UMB702 спостерігали інший характер розподілу частот алелів. Незалежно від кількості виявлених алелів, один із них траплявся зі значною частотою, яка істотно перевищувала таку всіх інших алелів певного локусу за відсутності достовірних відмінностей між іншими алелями. Так, за локусом Vmag0323, за яким виявлено 4 алелі, частота більш поширеного алелю 160 п. н. становила  $65,8 \pm 8,02$  %, що суттєво більше на  $50,1-58,7$  % ( $t_{\text{фактичне}}=4,96-6,44$  при  $t_{0,05}=2,04-2,06$ ) порівняно з частотами інших 3 алелів цього локусу, які дорівнювали  $7,1-15,7$  % та істотно не відрізнялися між собою. Частота алелю 148 п. н. становила  $11,4 \pm 5,37$ , при цьому 6 із 35 досліджених сортів (3 українських і 3 іноземних) мали, крім алеля 148 п. н., інші алелі даного локусу (1 сорт – 155 п. н., 2 сорти – 160 п. н., 3 сорти – 165 п. н.).

За локусом Vmag0760 більшого поширення набув алель 110 п. н. ( $74,3 \pm 4,34$  %). Інші два алелі цього локусу 105 п. н. та нуль-алель за частотою не відрізнялися ( $d=2,9 \pm 7,99$  %) та достовірно поступалися на  $62,9$  і  $60,0$  % від частоти алелю 110 п. н. ( $t_{\text{фактичне}}=9,12$  і  $8,17$ , відповідно, при  $t_{0,05}=2,04$  в обох випадках). Цікаво, що алель 110 п. н. траплявся у сортів і українських, і закордонних оригінальних, а алель 105 п. н. – тільки у 4 українських сортів (СПІ-НЦНС). Водночас серед українських сортів не виявлено жодного носія нуль-алелю.

За результатами мікросателітного аналізу сортів озимого ячменю за локусом UMB702, у більшості генотипів (29) детектували алель 280 п. н. (рис. 1). Частота трапляння даного алелю становила  $82,9 \pm 6,36$  % та суттєво перевищувала таку для нуль-алелю ( $t_{\text{фактичне}}=7,32$  при  $t_{0,05}=2,03$ ).

Морозостійкість і її зв'язок з алельними відмінностями сортів

Досліджувані сорти суттєво відрізнялися за рівнем морозостійкості й темпами загартування у процесі штучного проморожування (табл. 2). Зокрема, середня морозостійкість сортів вибірки при загартуванні 15 діб дорівнювала  $36,4$  % живих рослин, а морозостійкість окремих сортів варіювала від  $12,5$  до  $71,7$  %, тобто розмах варіювання становив  $52,9$  %. Збільшення тривалості загартування до 30 діб сприяло зростанню як середнього рівня морозостійкості до  $81,6$  %, так і рівня морозостійкості всіх сортів до  $38,8-81,6$  % і певного зменшення варіювання ознаки до  $42,8$  % порівняно з попереднім варіантом дослідження.

Поряд із тим, ранги сортів за морозостійкістю між варіантами 15 і 30 діб загартування значною мірою не збігаються ( $r=+0,54$ ). Темпи загартування у окремих сортах змінювалися від  $19,8$  до  $98,4$  %. При цьому більші темпи загартування властиві сортам із більш високою морозостійкістю при загартуванні 15 діб ( $r=+0,84$ ). Водночас темпи загартування не пов'язані з морозостійкістю при загартуванні 30 діб ( $r=+0,03$ ).

Порівняння груп сортів носіїв альтернативних алелів певного локусу дало змогу встановити суттєві відмінності між такими за однією або двома ознаками за 4 локусами з 5 поліморфних (табл. 3).

Такі відмінності відмічені за морозостійкістю при загартуванні 15 діб між сортами-носіями різних алелів локусу Vmag0760 і GMS061. При цьому більша морозостійкість властива носіям алелю 110 п. н. локусу Vmag0760 та 145 п. н. локусу GMS061. Тобто вказані алелі сприяють кращій морозостійкості рослин ячменю тільки у перші тижні росту. На відміну від двох попередніх локусів, алельні відмінності за локусом Vmag0223 суттєво

впливають на рівень морозостійкості на обох варіантах проморожування. Поряд із тим, більша морозостійкість при загартуванні 15 діб властива сортам-носіям алелю 160 п. н., а при загартуванні 30 діб – 127 п. н. Загалом ранги 3 кращих генотипів за даним локусом (150, 160, 127 п. н.) змінюються залежно від варіанта проморожування, а 2 інших, слабкіших за морозостійкістю (170 та 180 п.н.), – залишаються стабільними. Такі відмінності відмічені за морозостійкістю при загартуванні 15 діб між сортами-носіями різних алелів локусу *Vmag0760* і *GMS061*.

Таблиця 2

Характеристика сортів ячменю за показниками морозостійкості

Назва сорту	Показники морозостійкості, % <sup>1</sup>			Назва сорту	Показники морозостійкості, %		
	M1	M2	T3		M1	M2	T3
Gerlach	20,3	42,0	48,3	Одеський 170	13,8	42,8	32,2
Scarpia	23,6	70,1	33,7	Одеський 46	23,5	42,8	54,9
Sinderella	48,8	55,3	82,8	Оксамит	33,9	48,2	70,3
Абориген	28,8	64,4	44,7	Платон	33,3	67,8	49,1
Айвенго	37,9	78,9	48,0	Путнік	53,3	73,2	72,8
Академічний	33,3	78,3	42,5	Роман	66,1	67,7	98,4
Дев'ятий Вал	36,2	47,4	76,3	Росава	32,2	80,0	40,2
Державний	30,5	64,7	47,2	Селена Стар	15,5	38,8	40,7
Достойний	44,1	46,2	95,4	Снігова Королева	17,0	42,1	40,4
Еспада	22,6	42,8	52,8	Тігр	40,7	79,6	51,1
Жаворонок	43,9	48,1	91,2	Тимофей	50,9	70,3	72,4
Зимран	22,3	46,2	43,5	Трудівник	12,5	63,1	19,8
Кондрат	37,9	81,6	46,4	Хуторок	61,7	69,4	88,9
Кумач	59,3	67,7	87,6	$\bar{x}$	36,4	60,8	59,3
Манас	49,2	80,7	60,9	$S_x$	2,82	2,66	3,80
Метакса	23,6	41,3	57,1	$min$	12,5	38,8	19,8
Метелиця	71,7	78,5	91,3	$max$	71,7	81,6	98,4
Михайло	39,0	66,0	59,0	CV, %	43	24	36

**Примітки:** <sup>1</sup>M1 – морозостійкість при загартуванні 15 діб, M2 – морозостійкість при загартуванні 30 діб, T3 – темпи загартування

Алельні відмінності за локусом *Vmag0323* пов'язані з такими за темпами загартування. Більші темпи загартування властиві сортам-носіям алелю 165 п. н. даного локусу. Сорти з наявністю в генотипі альтернативних алелів 155 або 160 п. н. значно поступалися за даним показником вищезазначеному генотипу в 2,2 і 1,3 рази відповідно.

Алельні відмінності за локусом *UMB702* не були асоційовані з відмінностями із жодної з ознак.

Отже, з використанням ПЛР-аналізу досліджено алельний поліморфізм і розподіл мікросателітних алелів 9 мікросателітних локусів хромосоми 5Н, що розташовані в області ключових генів морозостійкості *Fr-H1* (bin11), *Fr-H2* (bin9-10) і беруть участь у формуванні НТ-стійкості ячменю. За результатами проведених досліджень генетичну варіабельність виявлено за локусами *Vmag 0223*, *Vmag0323*, *Vmag0760*, *GMS061*, *UMB702*. За 4 локусами *GBM1166*, *GBM1227*, *Vmag0113a*, *Vmag812* на даній вибірці сортів поліморфізм не виявлено.

Порівняння результатів аналізу поліморфних мікросателітних локусів і даних оцінки сортів за морозостійкістю показало достовірні асоціації між наявністю алельного поліморфізму за 4 локусами та показником рівня морозостійкості. Такі відмінності

відмічені за локусом Vmag0323 з темпами загартування та за локусами Vmag0760 і GMS061 з морозостійкістю при загартуванні 15 діб. Алейні відмінності за найбільш поліморфним мікросателітним локусом Vmag0223 (PIC=0,77) істотно пов'язані з рівнем морозостійкості сортів при загартуванні як 15, так і 30 діб, і даний мікросателітний маркер може бути рекомендований для негативного добору слабоморозостійких генотипів ячменю.

Таблиця 3

Морозостійкість і темпи загартування різних за аелями мікросателітних локусів груп сортів, % живих рослин

Локус	Ознаки <sup>1</sup>	Алелі, п. н.					F фактичне	F критичне
Vmag0760		н.а	105	110				
	M1	30,9	19,8	39,8		3,47	3,34	
	M2	46,2	53,1	64,0		2,84		
Vmag0323	T3	62,7	37,2	62,6		2,83		
		155	160	165				
	M1	21,5	33,2	47,8		2,97	3,42	
Vmag 0223	M2	63,9	58,8	63,7		0,23		
	T3	33,5	56,6	74,7		3,47		
		127	150	160	170	180		
UMB702	M1	42,5	37,9	46,2	26,7	20,5	2,83	2,75
	M2	68,8	67,6	61,1	49,5	42,1	3,77	
	T3	61,8	56,8	78,1	51,5	47,1	1,99	
GMS061		280	н.а.					
	M1	36,8	34,4			0,11	4,18	
	M2	59,5	66,5			1,07		
	T3	60,9	53,0			0,67		
		135	140	145				
	M1	21,6	38,5	41,6		4,08	3,34	
	M2	50,3	65,1	61,2		2,29		
	T3	43,5	62,1	64,5		2,32		

**Примітки:**<sup>1</sup> M1 – морозостійкість при загартуванні 15 діб, M2 – морозостійкість при загартуванні 30 діб, T3 – темпи загартування

Локуси 5Н хромосоми, які досліджували, є лише складовою частиною комплексної системи генів, що беруть участь у формуванні стійкості до низьких від'ємних температур, тому для подальшого аналізу й оцінки ефектів алелів на морозостійкість (у тому числі локусу Vmag 0223) необхідно використовувати спеціально створений генетичний матеріал.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бальвінська М. С., Нагуляк О. І., Файт В. І. Поліморфізм та добір морозостійких генотипів ячменю осіннього строку сівби за ДНК-маркерами хромосоми 5Н // Вісн. ХНАУ. Сер. біол. 2020. № 3 (51). С. 87–97. doi.org/10.35550/vbio2020.03.087.
2. Васильківський С. П., Гудзенко В. М., Кочмарський В. С., Кириленко В. В. Реалізація потенціалу сортів зернових культур – шлях вирішення продовольчої проблеми // Фактори експеримент. еволюції організмів. 2017. Т. 21. С. 47–51. doi.org/10.7124/FEEO.v21.805.
3. Гудзенко В. М., Васильківський С. П. Основні напрями та завдання селекції ячменю озимого у Центральному Лісостепу України // Новітні агротехнології. 2016. № 1. http://plant.gov.ua/uk/2016-1-2.



4. Іващенко О. О., Рудник-Іващенко О. О. Напрями адаптації аграрного виробництва до змін клімату // Вісн. аграр. науки. 2011. № 8. С. 10–12.
5. Лінчевський А. А., Легкун І. Б. Нове ставлення до культури ячменю і селекція в умовах зміни клімату // Вісн. аграр. науки. 2020. № 9. С. 34–42. doi.org/10.31073/agrovisnyk202009-05
6. Сиволап Ю. М., Бальвінська М. С., Захарова О. О. та ін. Молекулярні маркери у розвитку теорії і практики селекції ячменю: наук.-метод. посіб. Одеса: Астропринт, 2014. 86 с.
7. Стельмах А. Ф., Лінчевський А. А., Файт В. І. Физиолого-генетическая регуляция скорости начального развития ячменной осеннего срока сева // Фактори, експеримент. еволюції організмів. 2017. Т. 21. С. 199-204. doi.org/10.7124/FEEO.v21.835/
8. Agarwal M. Shrivastava N., Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences // Plant Cell Rep. 2008. Vol. 27. P. 617–631. doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z.
9. Ahres M., Gierczik K., Boldizsár A. et al. Temperature and Light-Quality-Dependent Regulation of Freezing Tolerance in Barley // Plants. 2020. Vol. 9. Iss.1. 83. doi.org/10.3390/plants9010083. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7020399.
10. Akar T., Francia E., Tondelli A. et al. Marker-assisted characterization of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Breed. 2009. Vol. 128. P. 381–386. doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01553.x
11. Beaubien K. A., Smith K. P. New SSR markers for barley derived from the EST database // BGN. 2006. Vol. 36. P. 30–43. https://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgn/36/Smith.htm
12. Dawson I. K., Russell J., Powell W. et al. Barley: a translational model for adaptation to climate change // New Phytol. 2015. Vol. 206. P. 913–931. doi.org/10.1111/nph.13266.
13. Dempewolf H., Baute G., Anderson J. et al. Past and future use of wild relatives in crop breeding // Crop Sci. 2017. Vol. 57. P. 1070–1082. doi.org/10.2135/cropsci2016.10.0885.
14. Dhillon T., Morohashi K., Stockinger E. J. CBF2A–CBF4B genomic region copy numbers alongside the circadian clock play key regulatory mechanisms driving expression of FR-H2 CBFs // Plant Mol. Biol. 2017. Vol. 94. P. 333–347. doi.org/10.1007/s11103-017-0610-z.
15. Dhillon T., Pearce S. P., Stockinger E. J. et al. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the VRN-1 connection // Plant Physiol. 2010. Vol. 153. P. 1846–1858. doi.org/10.1104/pp.110.159079.
16. Fisk S. P., Cuesta-Marcos A., Cistué L. et al. FR-H3: a new QTL to assist in the development of fall-sown barley with superior low temperature tolerance // Theor. Appl. Genet. 2013. Vol. 126. P. 335-347. doi.org/10.1007/s00122-012-1982-8.
17. Guerra D., Morcia C., Badeck F. Extensive allele mining discovers novel genetic diversity in the loci controlling frost tolerance in barley // Theor. Appl. Genet. 2022. Vol. 135. P. 563–569. doi.org/10.1007/s00122-021-03985-x.
18. Hasan N., Choudhary S., Naaz N. et al. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2021. Vol. 19. Iss. 1. P. 128. doi.org/10.1186/s43141-021-00231-1.
19. Rapacz M., Tyrka M., Mikulski W. Associations of PCR markers with freezing tolerance and photo-synthetic acclimation to cold in winter barley // Euphytica. 2010. Vol. 175. P. 293–301. doi.org/10.1007/s10681-010-0127-x.
20. Reinheimer J. L., Barr A. R., Eglinton J. K. QTL mapping of chromosomal regions conferring reproductive frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 109. P. 1267-1274. doi.org/10.1007/s00122-004-1736-3.

21. Rizza F., Karsai I., Morcia C. et al. Association between the allele compositions of major plant developmental genes and frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm of different origin // Mol. Breed. 2016. Vol. 36. P. 156. doi.org/10.1007/s11032-016-0571-y.
22. Rizza F., Pagani D., Gut M. et al. Diversity in the response to low temperature in representative barley genotypes cultivated in Europe // Crop Sci. 2011. Vol. 51. P. 2759-2779. doi.org/10.2135/cropsci2011.01.0005.
23. Rode J., Ahlemeyer J., Friedt W., Ordon F. Identification of marker-trait associations in the German winter barley breeding gene pool (*Hordeum vulgare* L.) // Mol. Breeding. 2012. Vol. 30. P. 831–843. doi.org/10.1007/s11032-011-9667-6.
24. Sharma P., Sharma N., Deswal R. The molecular biology of the low-temperature response in plants // Bioessays. 2005. Vol. 27. P. 1048-1059. doi.org/10.1002/bies.20307.
25. Tondelli A., Francia E., Barabaschi D. et al. Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley // Theor. Appl. Genet. 2006. Vol. 112. P. 445–454. doi.org/10.1007/s00122-005-0144-7.
26. Toth B., Francia E., Rizza F. et al. Development of PCR-based markers on chromosome 5H for assisted selection of frost-tolerant genotypes in barley // Mol. Breeding. 2004. Vol. 14. P. 265–273. doi.org/10.1023/B:MOLB.0000047774.01769.e6.
27. Varshney R. K., Marcel T. C., Ramsay L. et al. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci // Theor. Appl. Genet. 2007. Vol. 114. P. 1091–1103. doi.org/10.1007/s00122-007-0503-7.
28. Visionsi A., Tondelli A., Francia E. et al. Genome-wide association mapping of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) // BMC Genom. 2013. Vol. 14. P. 424–436. doi.org/10.1186/1471-2164-14-424.
29. Zhang G., Li Ch. Exploration, Identification and Utilization of Barley Germplasm. Zhejiang University Press Co., Ltd., 2016. 288 p. doi.org 10.1016/B978-0-12-802922-0.00008-X.

Стаття надійшла до редакції 26.09.22

доопрацьована 14.11.22

прийнята до друку 15.11.22

## **MICROSATELLITE LOCI POLYMORPHISM OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) CHROMOSOME 5H AND ASSOCIATION OF ALLELE WITH FROST RESISTANCE**

**M. Balvinska, S. Gavrylov, V. Fayt**

*Plant Breeding and Genetics Institute - National Center  
of Seed Science and Varieties Research  
3, Ovidiopolska Road, Odesa 65065, Ukraine  
e-mail: faygen@ukr.net*

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is a crop of great economic importance for many countries of the world, including Ukraine. One of the main reason limiting barley production in different regions of Ukraine is low-temperature stress. Prediction of frost resistance in the development and choice of resistant genotypes is one of the main tasks of the breeding. Applying the tools of molecular genetic analysis involves increasing the efficiency of traditional methods of identification and genotype screening with the necessary traits in a specific climatic area.

The 5H chromosomal loci are a component of a complex system of genes involved in the formation of resistance to low negative temperatures. The polymorphism and allele distribution of nine microsatellite loci in chromosome 5H, which are localisation in the region of the key NT- resistance genes *Fr-H1*, *Fr-H2* and close to these regions in 35 varieties of the autumn barley collection, were studied. Allelic polymorphism with the presence of two (UMB702) to five (Bmag0223) alleles was detected at the loci Bmag0223, Bmag0323, Bmag0760, GMS061 and UMB702. The frost resistance of 31 varieties with different durations of hardening was evaluated and essential differences between them were noted for this feature. According to the results of the analysis of polymorphism of microsatellite loci and data on evaluation of varieties for frost resistance, the connection of allelic differences of four out of five polymorphic loci with the level of frost resistance and hardening rates was revealed. Reliable associations were established between the presence of alleles Bmag0223, Bmag0323, Bmag0760, GMS061 and indicators of the level of frost resistance. Allelic differences at the UMB702 locus were not associated with differences in any of the traits. Alleles of the microsatellite locus Bmag0223 are recommended for negative choice of less frost-resistant barley genotypes at the early plant breeding stages.

*Keywords:* barley, PCR-analysis, microsatellites, DNA markers, frost resistance