

РАЗРАБОТКА НОВОГО ДНК-МАРКЕРА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ  
ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО SAAZ И ИСТРИНСКИЙ 15О.С. АЛЕКСАНДРОВ<sup>1</sup>, З.А. НИКОНОВА<sup>2</sup>, Г.И. КАРЛОВ<sup>3</sup><sup>1</sup> Центр молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;<sup>2</sup> ФГБНУ «Чувашский научно-исследовательский институт сельского хозяйства»;<sup>3</sup> ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии)

*Хмель обыкновенный – ценная сельскохозяйственная культура, возделываемая во многих странах мира. Продукция хмелеводства используется во многих отраслях народного хозяйства, прежде всего в хлебопечении и пивоварении. В связи с этим ведётся селекционная работа и выведение новых сортов хмеля. Для корректного ведения данной работы, а также для определения сортовой принадлежности хмелепродуктов часто необходимо прибегать к использованию молекулярного маркирования. В данной работе был разработан новый ДНК-маркер для идентификации широко известного чешского сорта Saaz и сорта отечественной селекции Истринский 15. Работа маркера основана на амплификации целевого фрагмента ДНК путём ПЦР и последующего гидролиза ПЦР-продуктов с помощью эндонуклеазы рестрикции BsuR I. Длина амплифицируемого фрагмента составляет 520 п.о. Была проведена апробация разработанного ДНК-маркера на 45 образцах коллекции сортов хмеля обыкновенного. Было установлено, что амплификация целевого фрагмента наблюдается у 8 образцов – Истринский 15, Saaz, Marynka, Izabella, First Choice, Shinsu Wase, K 692266 и K 700216. После проведения рестрикции большинство образцов показало одинаковый профиль получаемых фрагментов – 340, 240, 120, 90 и 80 п.о. Однако специфический рисунок профиля продуктов рестрикции был выявлен для сортов Saaz и Истринский 15. Профиль Saaz был самым простым – содержал только фрагменты длиной 340 и 90 п.о. Профиль сорта Истринский 15 содержал те же, характерные для Saaz, фрагменты 340 и 90 п.о., но имел и нерестрицированные фрагменты ПЦР-продукта длиной 520 п.о., а также фрагмент 500 п.о., не встречающийся ни у одного из сортов.*

**Ключевые слова:** хмель обыкновенный, сорт Saaz, сорт Истринский 15, молекулярное маркирование, ПЦР, рестрикция, идентификация сортов.

### Введение

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L., сем. Cannabaceae) – широко распространённый многолетний двудомный вид растений, используемый как ценная сельскохозяйственная культура [3]. Соплодия женских растений хмеля («шишки») используются в качестве сырья для получения дрожжей, используемых в хлебопечкарной и пивоваренной промышленности. Дубильные вещества «шишек» являются очень важными компонентами для регуляции брожения сусла и предотвращения

прокисание пива. Спектр же таких веществ, как эфирные масла, смолы и лупулин придают пиву своеобразный вкус и аромат [4]. Количественное содержание и соотношение содержащихся в «шишках» веществ во многом определяет ценность того или иного сорта хмеля как сырья для пивоварения.

Сорт хмеля обыкновенного Истринский 15 был выведен известным советским селекционером А.М. Пыжовым [7]. Это ценный ароматический сорт, подходящий для охмеления пива разных стилей, прежде всего лагеров. Поскольку лагеры были весьма популярны в СССР и до недавнего времени в России, сорт Истринский 15 выращивался на значительной части площадей, занятых хмелем. В настоящее время, когда активно развивается крафтовое пивоварение, данный сорт пользуется заметным спросом. Закупаемые для производства крафтового пива хмелепродукты, однако, часто представляют собой прессованные гранулы из «шишек», сортовую принадлежность которых невозможно определить по внешним признакам.

Данная проблема может быть решена с помощью применения молекулярного маркирования. Молекулярное маркирование – довольно широко распространённый метод, используемый как в теоретическом изучении различных таксономических групп живых организмов, так и в практической деятельности селекционеров растений и животных. Выявляемый с помощью молекулярных маркеров полиморфизм может послужить основой при подборе родительских пар, для паспортизации и идентификации сортов и др. Поскольку хмель является распространённой сельскохозяйственной культурой, постоянно разрабатываются новые молекулярные маркеры для изучения важных признаков, например, пола, а также для идентификации его сортов [1, 2, 5, 8, 9, 12].

В 1998 году японский генетик Araki с коллегами [8] разработал серию ДНК-маркеров для идентификации ряда сортов хмеля, которые, в основном, используются в Японии. Им был проведён подробный RAPD-анализ (Random Amplified Polymorphic DNA), после которого полиморфные фрагменты были вырезаны из геля и секвенированы. Подобрав специфичные праймеры на полученные секвенированные последовательности, он получил эффективные SCAR-маркеры (Sequence Characterized Amplified Region) для идентификации тех сортов, которые имели в RAPD-профилях вырезанные полиморфные фрагменты. SCAR-маркеры представляют собой, как правило, короткие (от 200 до 500 п.о.) уникальные фрагменты ДНК, которые легко амплифицируются в присутствии других фрагментов тотальной ДНК.

Однако стоит отметить, что SCAR-маркеры не позволяют различать сорта, у которых имеется точечный полиморфизм внутри ампликонов. Выявление такого рода полиморфизма возможно с помощью более чувствительных маркеров, например, CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК). Полиморфизм в данном случае выявляется после обработки ПЦР-продуктов специально подобранной эндонуклеазой рестрикции, сайт которой затрагивает полиморфный участок. В данной работе на основе одного из STS-маркеров, полученных Araki et al. (1998), – маркер А – был создан новый CAPS-маркер, позволяющий отличать сорта хмеля обыкновенного Saaz и Истринский 15 от ряда сортов отечественной и зарубежной селекции.

### **Методика исследований**

В качестве материала для опытов были использованы образцы сортов хмеля коллекции ФГБНУ «Чувашский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» (пос. Опытный, Чувашия) отечественной и зарубежной селекции (табл. 1).

## Сорта хмеля обыкновенного, используемые при апробации нового ДНК-маркера

№ п/п	Название образца	Происхождение
1	Подвязный	Россия
2	Svalef	Швеция
3	Fredos Dermal	Литва
4	Cascade 56013	США
5	Каунасский ранний	Литва
6	Keignorts midseason	Англия
7	Каунасский красивый	Литва
8	Saaz	Чехословакия
9	Сумерь	Россия
10	Крылатский	Россия
11	Zlatan	Чехословакия
12	Урожайный	Россия
13	Скороспелка московская	Россия
14	Призово	Болгария
15	Kono	Бельгия
16	Backa	Югославия
17	Wye Eastwell Golding	Англия
18	Norgaard 1478	Дания
19	Spalt	Германия
20	Willamete	США
21	Истринский 15	Россия
22	Флагман	Россия
23	Сполэчны	Украина
24	Tettnanger	Германия
25	Тиге Верта	Бельгия
26	Nadwislanski	Польша
27	Marynka	Польша
28	Smooth Cone	Новая Зеландия
29	First Choise	Новая Зеландия
30	Groene Bell	Бельгия
31	Кокнеан	Болгария
32	Tardir de Loraine	Франция
33	Precoce de Dienlorande	Франция
34	Au Holedava	Франция

№ п/п	Название образца	Происхождение
35	Гибрид V/69	Бельгия
36	Швейцарский	Швейцария
37	К 700216	Япония
38	Record	Бельгия
39	К 692266	Япония
40	Shinsu Wase	Япония
41	Atlas	Югославия
42	Eurhop	Бельгия
43	Apolon	Югославия
44	Красностебельный Истринский	Россия
45	Northern Brewer	Германия

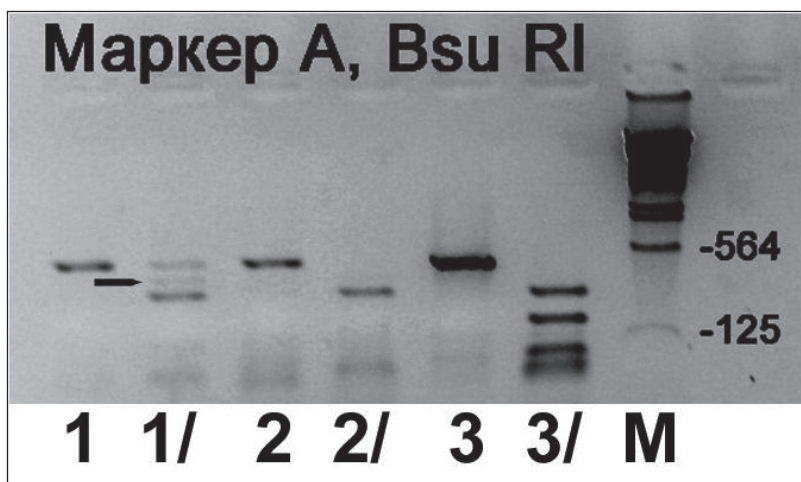
ДНК выделяли из молодых листьев по методике Doyle & Doyle, 1990 [10]. Скрининг коллекции проводили с использованием маркера А (**Ahm-f**: 5'-GGTCAGGCA CCAATGTAAGCTGGC-3'; **Ahm-r**: 5'-GGTCAGGCACCAAGGCCACCATCTG-3'), согласно условиям авторов [8]. Рестрикцию ПЦР-продуктов проводили с использованием рестриктазы *BsuR I* при 37°C в течение 8 ч. Электрофорез ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции проводили в 1,5% агарозном геле при 5 В/см в течение 1 ч.

### Результаты и их обсуждение

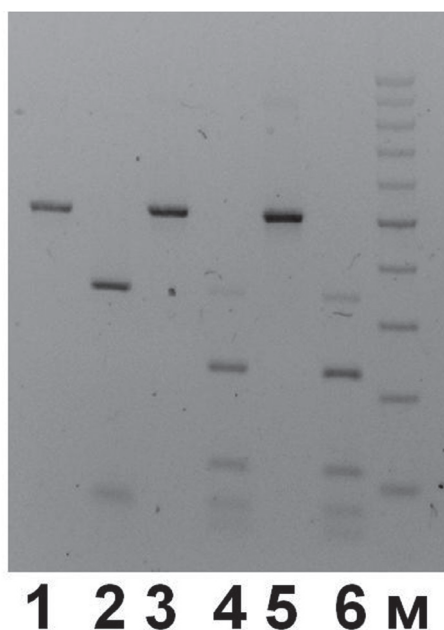
Коллекция сортов хмеля была проанализирована с помощью маркера А [8]. При стандартных, предлагаемых авторами условиях амплификации, наблюдалась наработка продуктов ожидаемой длины (единичный фрагмент 520 п.о.) у 8 сортов (Истринский 15, Saaz, Marynka, Izabella, First Choice, Shinsu Wase, К 692266 и К 700216) из 45 изучаемых. Заставляет обратить на себя внимание тот факт, что праймеры маркера А были созданы Araki et al. (1998) на основе результатов RAPD-анализа коллекции сортов, в которую входили Saaz и Shinsu Wase). Работа данных праймеров была подтверждена и в нашем эксперименте на этих сортах. Сам по себе Saaz известен с давних времён (был выведен Жатецкими пивоварами около XV–XVI вв.) и входит в родословные многих сортов хмеля ароматического типа. Анализ родословных 6 из 8 сортов, на которых идёт амплификация с праймерами маркера А, показал, что Saaz является одной из родительских форм отечественного сорта Истринский 15 (Saaz×(Клон 18×Дикий из Тибета)) и японского Shinsu Wase (Saaz×(White Vine×? свободное опыление)) [6, 11]. Два образца, родословные которых неизвестны, – это номерные образцы из Японии К 692266 и К 700216. Они, скорее всего, связаны по своему происхождению с Shinsu Wase, который до недавнего времени был несомненным лидером по коммерческим площадям в Японии и широко использовался в селекционной работе японских хмелеводов. В родословных оставшихся трёх сортов – двух польских (Marynka, Izabella) и одного новозеландского (First Choice) присутствие Saaz не было выявлено. Однако все эти восемь сортов показали отсутствие отличий по длине ПЦР-продукта.

Для более глубокого анализа генетических отличий между фрагментами ПЦР-продуктов изучаемых сортов была использована одна из «часто режущих» рестрик-

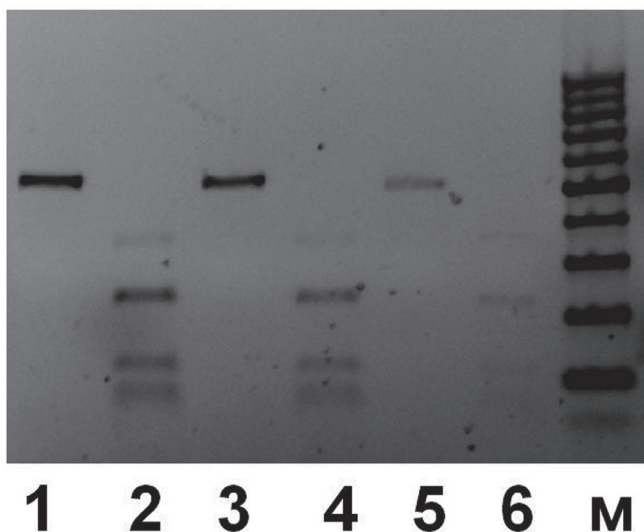
таз – *BsuR I* (сайт рестрикции GG/CC). Результаты рестрикции действительно позволили выявить такие отличия между сортами. Было зафиксировано 3 типа профилей (рис. 1). Профиль Saaz был самым простым – содержал фрагменты длиной 340 и 90 п.о. Группа сортов Marynka, Izabella, First Choice, Shinsu Wase, K 692266 и K 700216 помимо фрагментов, характерных для Saaz, содержала ещё дополнительные фрагменты длиной 240, 120 и 80 п.о. (рис. 2, 3). И, наконец, третий тип профиля принадлежал сорту Истринский 15. Он содержал те же, характерные для Saaz, фрагменты 340 и 90 п.о., но имел и нерестрицированные фрагменты ПЦР-продукта длиной 520 п.о., а также фрагмент 500 п.о., не встречающийся ни у одного из сортов.



**Рис. 1.** Результаты электрофореза ПЦР-продуктов (маркер А) и продуктов рестрикции *BsuR I* (отмечены «/» после номера образца). Сорта: 1 – Истринский 15 (Россия), 2 – Saaz (Чехия), 3 – Izabella (Польша). «М» – маркер молекулярного веса – ДНК фага λ, расщеплённая смесью рестриктаз *EcoR I* и *Hind III*. Стрелкой указан полиморфный фрагмент длиной 500 п.о. в профиле продуктов рестрикции сорта Истринский 15.



**Рис. 2.** Результаты электрофореза ПЦР-продуктов (маркер А) 1–3–5 и продуктов рестрикции *BsuR I* 2–4–6. Сорта: 1,2 – Saaz (Чехия); 3,4 – Marynka (Польша); 5,6 – Shinsu Wase (Япония). «М» – маркер молекулярного веса – 100 bp ... 1000 bp с шагом 100 bp.



**Рис. 3.** Результаты электрофореза ПЦР-продуктов (маркер А) 1–3–5 и продуктов рестрикции *BsuR I* 2–4–6. Сорта: 1,2 – Smooth Cone (Чехия); 3,4 – К 700216 (Япония); 5,6 – К 692266 (Япония). «М» – маркер молекулярного веса – 50 bp, 100 bp ... 1000 bp с шагом 100 bp.

### Заключение

Таким образом, с помощью праймеров маркера А и рестриктазы *BsuR I* (CAPS-маркер) можно проводить эффективную идентификацию сорта Saaz и сорта Истринский 15. Данный CAPS-маркер может найти широкое применение в селекционной работе, анализе сортового состава хмелепродуктов, а также в генетическом картировании хромосом хмеля обыкновенного.

### Благодарности

Работа была выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ, договор № 14.W01.17.121-МК от 22 февраля 2017 года.

### Библиографический список

1. Александров О.С., Дивашук М.Г., Фесенко И.А., Карлов Г.И. Клонирование прилегающих регионов Y-хромосомспецифичной последовательности ДНК хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) // Известия ТСХА. 2010. № 3. С. 5–11.
2. Александров О.С., Данилова Е.С., Данилова Ю.С., Карлов Г.И. Поиск сортоспецифичных молекулярных маркеров для идентификации новых сортов хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2012. № 2. С. 26–30.
3. Бурый Д.Ю. Хмелеводство: Учебно-методический комплекс (для студентов, обучающихся по специальности 3102 «Агрономия») // Горно-Алтайск, РИО ГАГУ, 2010. – 47 с.
4. Губанов И.А. и др. Дикорастущие полезные растения СССР / отв. ред. Т.А. Работнов. – М.: Мысль, 1976. – С. 100. – 360 с. – (Справочники-определители географа и путешественника).



5. Данилова Т.В., Данилов С.С., Карлов Г.И. Исследование полиморфизма сортов хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) с использованием ISSR-ПЦР-анализа // Генетика. 2003. Т. 39. № 11. С. 1484–1489.

6. Данилова Ю.С. Типы хмеля в зависимости от биохимического состава // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2008. № 11. С. 51–56.

7. Темирбекова С.К., Куликов И.М., Казаков О.Г. Развитие научного наследия Н.И. Вавилова учеными МОБИР, ныне ГНУ ВСТИСП // Овощи России. 2012. Т. 16. № 3. С. 25–29.

8. Araki S., Tsuchiya Y., Masachika T., Tamaki T., Shinotsuka K. Identification of hop cultivars by DNA marker analysis // J. Am. Soc. Brew. Chem. 1998. № 56. P. 93–98.

9. Danilova T.V., Karlov G.I. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.) // Euphytica. 2006. Vol. 151. № 1. P. 15–21.

10. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12. № 1. P. 13–15.

11. Healey J. The hops list: 265 beer hop varieties from around the world // <http://www.hopslist.com/hops/aroma-hops/shinshuwase/>

12. Patzak J., Vrba L., Matoušek J. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.) // Genome. 2007. Vol. 50. № 1. P. 15–25.

## DEVELOPMENT OF A NEW DNA MARKER FOR THE IDENTIFICATION OF SAAZ AND ISTRINSKY 15 HOP VARIETIES

O.S. ALEKSANDROV<sup>1</sup>, Z.A. NIKONOVA<sup>2</sup>, G.I. KARLOV<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Centre for Molecular Biotechnology of Russian Timiryazev State Agrarian University;

<sup>2</sup> Chuvash Research Institute of Agriculture;

<sup>3</sup> All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology)

*Common hop is a valuable crop cultivated in many countries of the world. Hop-growing products are used in many branches of the national economy, primarily in bakery and brewing. In this connection, selection work and breeding of new hop varieties are conducted. To ensure correct results of this work, as well as to identify the variety of hop products, it is often necessary to make use of molecular marking. This paper describes the development of a new DNA marker to identify Saaz (a widely known Czech variety) and Istrinsky 15 (a Russian variety). The marker works by amplifying the target DNA fragment by means of PCR and subsequent hydrolysis of 3CK-products with the BsuR I restriction enzyme. The length of the amplicon is 520 bp. The DNA marker has been tested in 45 samples from the collection of common hop varieties. The amplification of the target fragment has been observed in 8 samples – Istrinsky 15, Saaz, Marynka, Izabella, First Choice, Shinsu Wase, K 692266 and K 700216. After the restriction, most of the samples showed the same profile of the obtained fragments - 340, 240, 120, 90 and 80 bp. However, specific patterns of the restriction products have been detected for the Saaz and Istrinsky 15 varieties only. The pattern of Saaz has proved to be the simplest one as it includes 340 bp and 90 bp fragments only. The pattern of Istrinsky 15 includes the same 340 bp and 90 bp fragments as those of “Saaz” plus non-restricted fragments of PCR-products of 520 bp as well as a 500 bp fragment that has not been found in other varieties.*

**Key words:** common hop, the Saaz hop variety, the Istrinsky 15 hop variety, molecular marking, PCR, restriction, variety identification.

## References

1. Aleksandrov O.S., Divashuk M.G., Fesenko I.A., Karlov G.I. Klonirovaniye prilegayushchikh regionov Y-khromosomspetsifichnoy posledovatel'nosti DNK khmelya obyknovennogo (*Humulus lupulus* L.) [Cloning of the adjacent regions of the Y chromosome-specific DNA sequence of common hop (*Humulus lupulus* L.)] // *Izvestiya TSKhA*. 2010. No. 3. P. 5–11.
2. Aleksandrov O.S., Danilova Ye.S., Danilova Yu.S., Karlov G.I. Poisk sortospetsifichnykh molekulyarnykh markerov dlya identifikatsii novykh sortov khmelya obyknovennogo (*Humulus lupulus* L.) [Searching for sort-specific molecular markers to identify new common hop varieties (*Humulus lupulus* L.)] // *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka*. 2012. No. 2. P. 26–30.
3. Buryy D.Yu. Khmelevodstvo: Uchebno-metodicheskiy kompleks (dlya studentov, obuchayuschikhsya po spetsialnosti 3102 “Agronomiya”) [Hops: Set of study and methodical materials (for students of Specialty 3102 “Agronomy”)] // Gorno-Altaysk, RIO GAGU. 2010. – 47 p.
4. Gubanov I.A. i dr. Dikorastushchie poleznye rasteniya SSSR [Wild plants of the USSR] / Ed. by T.A. Rabotnov. – M.: Mysl, 1976. – P. 100. – 360 p. – (Spravochniki-opredeliteli geografa i puteshestvennika).
5. Danilova T.V., Danilov S.S., Karlov G.I. Issledovanie polimorfizma sortov khmelya obyknovennogo (*Humulus lupulus* L.) s ispolzovaniem ISSR-PCR-analiza [Study of polymorphism of common hop varieties (*Humulus lupulus* L.) using ISSR-PCR analysis] // *Genetika*. 2003. Vol. 39. No. 11. P. 1484–1489.
6. Danilova Yu.S. Tipy khmelya v zavisimosti ot biokhimicheskogo sostava [Types of hops depending on their biochemical composition] // *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka*. 2008. No. 11. P. 51–56.
7. Temirbekova S.K., Kulikov I.M., Kazakov O.G. Razvitie nauchnogo naslediya N.I. Vavilova uchenymi MOVIR, nyne GNU VSTISP [Development of the scientific heritage of N.I. Vavilov by scientists of former MOVIR, present SSI VSTISP] // *Ovoschi Rossii*. 2012. Vol. 16. No. 3. P. 25–29.
8. Araki S., Tsuchiya Y., Masachika T., Tamaki T., Shinotsuka K. Identification of hop cultivars by DNA marker analysis // *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1998. No. 56. P. 93–98.
9. Danilova T.V., Karlov G.I. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.) // *Euphytica*. 2006. Vol. 151. No. 1. P. 15–21.
10. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. Vol. 12. No. 1. P. 13–15.
11. Healey J. The hops list: 265 beer hop varieties from around the world // <http://www.hopslist.com/hops/aroma-hops/shinshuwase/>
12. Patzak J., Vrba L., Matoušek J. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.) // *Genome*. 2007. Vol. 50. No.1. P. 15–25.

**Александров Олег Сергеевич** – к. б. н., с. н. с. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; (499) 977-72-01; e-mail: oleg.sandrov@gmail.com).



**Никонова Зоя Александровна** – науч. сотр. ФГБНУ «Чувашский НИИСХ» (429911, Чувашская Республика, Цивильский р-н, пос. Опытный, ул. Центральная, д.2; (83545) 61-1-10; e-mail: chnisx@mail.ru).

**Карлов Геннадий Ильич** – д. б. н., проф., чл.-корр. РАН, и. о. директора ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42; (499) 976-65-44; e-mail: iab@iab.ac.ru).

**Oleg S. Aleksandrov** – PhD (Bio), Senior Researcher of the Centre for Molecular Biotechnology of Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; phone: (499) 977-72-01; e-mail: olegsandrov@gmail.com).

**Zoya A. Nikonova** – Researcher of FSBSI “Chuvash Research Institute of Agriculture” (429911, the Chuvash Republic, the Tsvilsk district, the village of Opytny, Tsentralnaya Str., 2; phone: (83545) 61-1-10; e-mail: chnisx@mail.ru).

**Gennady I. Karlov** – DSc (Bio), Professor, Corresponding Member of RAS, Acting Director of All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; phone: (499) 976-65-44; e-mail: iab@iab.ac.ru).