


АГРОНОМІЯ

УДК: 633.282:582.623.2:620.952:575.22:575.8:577.02

Вивчення поліморфізму за ISSR маркерами представників біоенергетичних культур родів *Miscanthus* та *Salix*Баб'яж А.І. , Чередничок О.І. , Григоренко Н.А. 

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

 mgplab13@gmail.com, bono02@ua.fm, grygorenko.na@gmail.com

Баб'яж А.І., Чередничок О.І., Григоренко Н.А. Вивчення поліморфізму за ISSR маркерами представників біоенергетичних культур родів *Miscanthus* та *Salix*. Збірник наукових праць «Агробіологія», 2021. № 2. С. 7–14.

Babiazh A., Cherednychok O., Hryhorenko N. Studying polymorphism through ISSR markers of the genus *Miscanthus* and *Salix* bioenergy cultures representatives. «Agrbiology», 2021. no. 2, pp. 7–14.

Рукопис отримано: 06.08.2021 р.

Прийнято: 23.08.2021 р.

Затверджено до друку: 09.12.2021 р.

doi: 10.33245/2310-9270-2021-167-2-7-14

Метою роботи є аналіз геному представників міскантусу та верби енергетичної, які належать колекції ІБКіЦБ НААН України, методом ISSR – PCR для оцінювання їх генетичного різноманіття та виявлення рівня поліморфізму. Розвиток біоенергетики у світі та Україні спонукав сільгоспвиробників до використання культур, що раніше не були об'єктом їх уваги, як біоенергетичних рослин. У роботі використано класичні лабораторні методи для проведення ПЛР аналізу, а саме виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR –аналіз), електрофоретичний розподіл одержаних ПЛР-продуктів в агарозному гелі, статистичний метод. Виділення ДНК проводили стандартним методом екстракції ЦТАБ. Тотальну ДНК виділяли з вегетативних органів, окремо з кожної рослини.

Для аналізу молекулярно-генетичного поліморфізму роду *Miscanthus* було використано три праймери ISSR. У результаті ампліфікації виявлено 14 локусів, 13 з яких були поліморфними. Індекс поліморфізму локусів коливався від 0,83 до 0,95. За допомогою праймерів ISSR 2 та ISSR 4 виявлено 100 % поліморфізм, оскільки 11 локусів, виявлених за їх участю, були поліморфними. Використання ISSR 1 дало змогу виявити три алелі: один – у *M. sinensis Andersson*, два алелі – у *M. sacchariflorus (Maxim.) Franch.*, а три амплікони виявлено у *M. giganteus JM Greef & Deuter ex Hodkinson*. Для аналізу молекулярно-генетичного поліморфізму роду *Salix* було використано два праймери – ISSR 2 та ISSR 4. Встановлено, що інформативним було застосування праймера ISSR 4, за допомогою якого виявлено 7 ампліконів, з показником індексу поліморфності локусу 0,38, за частоти алелей в межах 0,2–0,8. Отже, є амплікони, які присутні в більшості зразків вибірки. Амплікони з частотою 0,2 та довжиною 570 і 720 п.н зустрічаються у двох зразках – клон верби шведський та верба шерстистопагінцева.

Найбільшу кількість поліморфних локусів було отримано за допомогою праймера ISSR 4. За вивчення *M. giganteus* виявлено алелі, що підтверджують його гібридне походження. Праймер ISSR 4 також може бути використаний для диференціації представників роду *Salix*, адже виявив амплікони з довжиною 570 і 720 п.н. з частотою 0,2, які зустрічаються у двох зразках: клон верби шведський та верба шерстистопагінцева, і його доцільно використовувати для диференціації представників роду *Salix*. Використання отриманих даних дає змогу оцінити генетичне різноманіття наявних видів роду *Miscanthus* та *Salix* для точної їх ідентифікації серед зразків колекції.

Ключові слова: генотипи, род *Miscanthus*, род *Salix*, ISSR-поліморфізм, локуси.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Біоенергетика, або енергетика на основі біомаси, посідає досить відокремлене місце серед відновлюваних енергетичних ресурсів. На відміну від енергії Сонця та вітру, які нерідко називають новими видами енергії, спалювання біомаси (дров, торфу) для обігріву та приготування їжі – одне з найстаріших джерел отримання енергії людиною. Отже, цей вид енергоресурсу зовсім не новий. Однак альтернативним є процес отримання енергії та раціоналізація методів використання цього енергоресурсу [1, 2]. Основною перевагою використання відновлюваних енергоресурсів є їх невичерпність та відносна екологічна чистота порівняно з мінеральними видами палива, основним недоліком – періодичність отримання та неоднаковий енергетичний потенціал. Однак цей недолік можна ліквідувати за умови комплексного використання різних видів відновлюваних джерел та акумуляторів енергії [3]. Виділяють наступні основні групи відновлюваних органічних енергоносіїв [4]: 1 – деревина, її відходи, продукти санітарної рубки лісів, торф, листя, тирса та ін.; 2 – рослини, які спеціально вирощують для енергетичних потреб (тополя, верба, міскантус, водорості тощо); 3 – відходи сільськогосподарського виробництва рослинного та тваринного походження (стебла рослин, лушпиння, гній, послід та ін.); 4 – відходи життєдіяльності людей, зокрема промислової діяльності (тверді та рідкі побутові стоки, відходи харчової промисловості, сміття та ін.). Надзвичайно бурхливий розвиток біоенергетики у світі спонукав до широкого використання нових культур, які раніше не були об'єктом уваги сільгоспвиробників. Це призвело до створення популяцій біоенергетичних культур, походження яких часто не встановлено, а подекуди, взагалі не досліджувалось. Сучасна селекція біоенергетичних культур спрямована на підвищення вмісту целюлози, сухої речовини, підвищення продуктивності біомаси [5, 6].

Сучасна селекція спрямована на отримання сортів з високими базовими показниками продуктивності: підвищеною урожайністю сухої біомаси, посухостійкістю, зимостійкістю та наявністю у своєму складі природних біополімерів. Одна з найбільш перспективних біоенергетичних культур – міскантус [7, 8]. За даними IENICA-CROPS DATABASE, продуктивність *Miscanthus giganteus* наразі становить 11,7–25,3 т/га сухої біомаси на рік, а результати визначення хімічного складу підтверджують вміст целюлози в межах 44 %, лігніну – 17 % та геміцелюлози – 24 % [9, 10]. Рослини роду *Miscanthus* характеризуються широким

рівнем різноманіття за морфологією та плоідністю. Розповсюджений *M. giganteus* J.M. Greef & Deuter ex Hodkinson & Renvoize є природним триплоїдом, оскільки це гібрид між диплоїдом *M. sinensis* Andersson та тетраплоїдом *M. sacchariflorus* (Maxim.) Franch. Ефективна продуктивність біомаси отриманого триплоїда обумовлена ефектом гетерозису, який зазвичай виникає у гібридних сортів. Водночас не встановлено генетичні джерела їх походження, локальність використання та особливості їх модифікаційних варіацій [11, 12]. Отже, постає необхідність у проведенні досліджень із застосуванням генетичних маркерів наявних селекційних зразків, найбільш цінних для подальшої селекційної роботи. Адже відбір вихідного матеріалу базується на потребі максимально реалізувати потенціал генетичного різноманіття досліджуваних видів. Застосування новітніх методів аналізу селекційного матеріалу дасть змогу значно зменшити затрати та оптимізувати селекційний процес [13].

Для характеристики генетичних ресурсів із колекцій RBG Kew та ADAS Arthur Rickwood Research Station, Великобританія під час порівняльного аналізу [14] використовували маркери AFLP (Amplified fragment length polymorphism – праймери зі штучно доданими послідовностями – адаптерами) та ISSR (Inter simple sequence repeat – маркери, засновані на міжмікросателітних послідовностях). Для генотипів *M. giganteus* (11 таксонів) не було виявлено змін за допомогою маркерів ISSR та незначних варіацій, на відміну від *M. sinensis* (50 таксонів), для якого встановлено високий рівень варіацій. В іншому дослідженні [15] підтверджено, що 14 з 15 зразків *M. giganteus*, що зібрані з ботаничних садів Дубліна, Ірландія та Університету Гогенхайма, Німеччина, які були проаналізовані за допомогою SSR маркерів за 6 локусами, належали до одного гаплотипу, тимчасом аналіз *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* вказував на високий рівень поліморфізму для певних алелів.

Мета дослідження полягала в аналізі генетичної представників міскантусу та верби енергетичної методом ISSR – PCR для оцінювання їх генетичного різноманіття та виявлення рівня поліморфізму. Для дослідження рівнів молекулярно-генетичного поліморфізму у представників рослин біоенергетичних культур необхідно вивчати високоваріабельні послідовності, які б дали змогу диференціювати близькородинні об'єкти. Варіабельним мікросателітам властивий кодомінантний тип успадкування, що дає можливість виявляти гетерозиготи. Отже, доцільно використовувати ISSR-ПЛП (inter simple sequence repeats), що має низку переваг порів-

няно з іншими модифікаціями ПЛР, по-перше: немає необхідності у попередньому секвенуванні досліджуваних послідовностей, по-друге: досліджується суттєва частина геному, оскільки участки, що є комплементарними до ISSR-праймерів, локалізовані по всьому геному.

Матеріал і методи дослідження. Представники видів роду *Miscanthus* характеризуються різноманітністю, однак джерела походження представників різних видів, а іноді і в межах одного виду, не встановлено. Нині створено понад 100 сортів міскантусу, що відрізняються формою і забарвленням суцвіть – від чисто білого і рожевого до коричнево-бордового, а також формою, розміром і забарвленням листків – від тонких, витончено вигнутих, до міцних вертикальних, мають зелене, жовтувате, рожеве, коричневе забарвлення та поздовжні або поперечні смуги білого, кремового або жовтого кольору [16]. Верби (*Salix L.*) – це дводомні листопадні ентомофільні фанерофіти з симподіальним типом наростання пагонів, черговим розміщенням листків, суцвіттями-сережками, сильно зредукованою оцвіткою і дрібним насінням, забезпеченими пучком волосків. Ця група рослин вирізняється високим рівнем внутрішньовидової мінливості і високою видовою різноманітністю (до роду *Salix* належать 300–500 видів і таксонів видового рангу). Ще одна особливість верб – здатність до міжвидової гібридизації (ауткросингу), причому, успіх гібридизації не завжди корелює з рівнем плодючості і положенням у системі роду [17, 18].

Вивчення генетичного різноманіття проводили на сформованих модельних популяціях груп рослин різних видів роду *Miscanthus* та роду *Salix* колекції Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України. До складу модельної популяції роду *Miscanthus* залучено 10 зразків: *M. giganteus* – 6, *M. sinensis* – 3, *M. sacchariflorus* – 2.

Для проведення оцінювання молекулярно-генетичного поліморфізму колекції роду *Salix* створено модельну популяцію, яка складається з 10 представників: верба прутувидна *S. viminalis L.*, верба тритичинкова класична *S. triandra L.*, верба матсуда (звивиста) *S. matsudana Vill*, верба попеляста *S. cinerea*

L., верба біла *S. alba L.*, верба біла, різновид з жовтою корою *S. alba L.*, клон верби шведський *S. viminalis L.*, верба шерстистопагінцева *S. dasyclados L.*, верба гостролиста *S. acatifolia L.*, сорт верби Збруч *S. viminalis L.*

У роботі використовували лабораторні методи: виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції, електрофоретичний розподіл одержаних ПЛР-продуктів в агарозному гелі, розраховували статистичні показники, а саме індекс поліморфності локусу за формулою: $PI = 1 - p^2 - q^2$, де p – присутність амплікона, q – відсутність амплікона; та відсоток поліморфізму, як відношення поліморфних ампліконів до загального числа детектованих ампліконів [19].

Для виділення ДНК з рослинного матеріалу застосовували стандартний метод екстракції з використанням ЦТАБ – цетилтриметиламонію бромід. ДНК розчиняли у 50–100 мкл ТЕ розчину з додаванням РНКаз А (кінцева концентрація ДНК 1 мкг/мл). Концентрацію виділеної ДНК визначали в 0,8 % агарозному гелі відповідно до стандартних розчинів [20, 21].

Постановку ПЛР проведено з використанням наборів реагентів PCR Mix 2x (NEOGENE). До її складу входила інгібована для «гарячого старту» Таq-полімераза, суміш дезоксинуклеозидтрифосфатів та $MgCl_2$ в складі оптимізованої буферної системи. Реакційна суміш для проведення аналізу об'ємом 20 мкл містила такі компоненти: 10 мкл 2X суміші для ПЛР; 20 нг досліджуваної ДНК та відповідну кількість праймера.

Підбір праймерів для аналізу рослин проводили за літературними даними, водночас враховували генетичні маркери, що характеризувались високим рівнем диференційної здатності. Основні структурні характеристики та оптимальну температуру відпалу праймерів наведено у таблиці 1 [19].

Під час проведення ПЛР з HotStart Taq ДНК полімеразою дотримувались таких температурних умов: 1 крок – початкова денатурація – 10 хв за 94 °C; 2 крок – 30–33 цикли – 0,5 хв денатурація за 93 °C, 0,5 хв відпал за температури відповідно до характеристики праймеру, елонгація 1 хв за 72 °C; 3 крок – заключна елонгація – 5 хв за 72 °C.

Таблиця 1 – Характеристика залучених в роботу ISSR –праймерів

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність 5' 3'	К-ть нуклеотидів, шт.	CG-склад, %	Температура відпалу, °C
ISSR 1	CTgCTgCTgCTgCTgCTgCTg	22	68,2	67,7
ISSR 2	gAggAggAggAggAggAgC	19	68,4	64
ISSR 4	gACAgACAgACAgACAgACA	20	50	58

Після закінчення ПЛР проводили електрофоретичне розділення продуктів у 2 % агарозному гелі з додаванням броміду етидію в 1X TBE за постійної напруги 2–6 В/см² гелю впродовж трьох годин [20, 21].

Фіксацію електрофоретичного розподілу продуктів ПЛР проводили за допомогою системи документування гелів, що складається з транслюмінатора, який випромінює світло в ультрафіолетовому діапазоні, відеосистеми з цифровою камерою та комп'ютера для аналізу отриманих зображень [20, 21].

Результати дослідження та обговорення.

У дослідженнях робоча вибірка складалась з 10 рослин кожного з представників біоенергетичних культур, ДНК виділяли з вегетативних органів відібраних матеріалів, індивідуально з кожної рослини. Вивчаючи 18 різновидів представників роду *Miscanthus* 15 ISSR праймерами, автори [19] виявили 112 алелей з 100 % поліморфізмом, тому ці праймери було використано в роботі. Під час аналізу методом ISSR – PCR молекулярно-генетичного поліморфізму рослин роду *Miscanthus* колекції Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України було виявлено 14 локусів, з яких 13 були поліморфними, що свідчить про високий рівень поліморфізму. Високу диференційну здатність локусу доводив його індекс поліморфності, який коливався у межах від 0,83 до 0,95 (таблиця 2).

Дослідження рослинних зразків роду *Miscanthus* з використанням маркерів ISSR 2 та ISSR 4 виявили 100 % поліморфізм, оскільки отримані за їх участі 11 локусів були поліморфними. Робочу вибірку сформовано на основі популяцій, про що свідчить високий рівень поліморфізму, адже переважна частка локусів виявилась поліморфною.

За умов проведення ПЛР з використанням праймера ISSR 1 було отримано 3 амплікони, що можуть бути алелями одного локусу. Аналіз дослідних зразків *M. sinensis* дав змогу виявити 1 алель, у *M. sacchariflorus* було виявлено 2 алелі, для *M. giganteus* встановлено наявність трьох аналогічних алелів. Виявлені алелі у *M. giganteus*, отримані з використанням праймера ISSR 1, підтверджують його гібридне походження від схрещування між *M. sinensis* та *M. sacchariflorus*. Спектри ампліконів, що отримано з використанням зазначених вище праймерів, дають змогу диференціювати представників роду *Miscanthus* різних видів, адже встановлено різницю за кількістю ампліконів для кожного представника виду. У *M. sinensis* виявлено від 1 до 2 ампліконів, у *M. sacchariflorus* – від 1 до 3, у *M. giganteus* – від 3 до 4.

У результаті ISSR аналізу для рослин роду *Salix* було виявлено 12 алелів з відсотком поліморфізму 60.

Розмір отриманих фрагментів для праймера ISSR 1 становив 130–590 п.н., для праймера ISSR 4 – 95–720 п.н. Показник індексу поліморфності праймера ISSR 1 становив 0,44, що вказує на інформативність цього праймера для проведення аналізу представників роду *Salix*. Розрахунок частоти детектованих алелів, виявлених за допомогою цього праймера, в межах 0,2–0,5, що свідчить про наявність ампліконів у двох або половині зразків вибірки.

Інформативним також є застосування маркера ISSR 4, виявлено 7 ампліконів з показником індексу поліморфності локусу 0,38, за частоти алелів 0,2–0,8. Тобто є амплікони, які присутні в більшості зразків вибірки. Амплікони з частотою 0,2 та довжиною 570 і 720 п.н зустрічаються у двох зразках: клон верби шведський та верба шерстистопагінцева.

Таблиця 2 – Поліморфізм ISSR-локусів, виявлених у рослин роду *Miscanthus*

Назва праймера	Всього локусів	% поліморфізму	Індекс поліморфності локусу (PIC)	Розмір алелів, п. н.
ISSR 1	3	67	0,95	205-450
ISSR 2	5	100	0,87	300-710
ISSR 4	6	100	0,83	450-720

Таблиця 3 – Розмір отриманих ампліконів під час аналізу поліморфізму зразків *Salix*

Маркер	Кількість алелів, шт.	Розмір алелів, п. н.	Індекс поліморфності локусу (PIC)	% поліморфізму	Частоти алелів
ISSR 1	5	130-590	0,44	60	0,2-0,5
ISSR 4	7	95-720	0,38	60	0,2-0,8

Цей праймер може бути використано для диференціації представників роду *Salix*. Загальна кількість ампліконів, виявлених під час проведення дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму рослин роду *Salix* з метою оцінювання їх генетичного різноманіття з праймером ISSR 4, становила 32 (рис. 1).

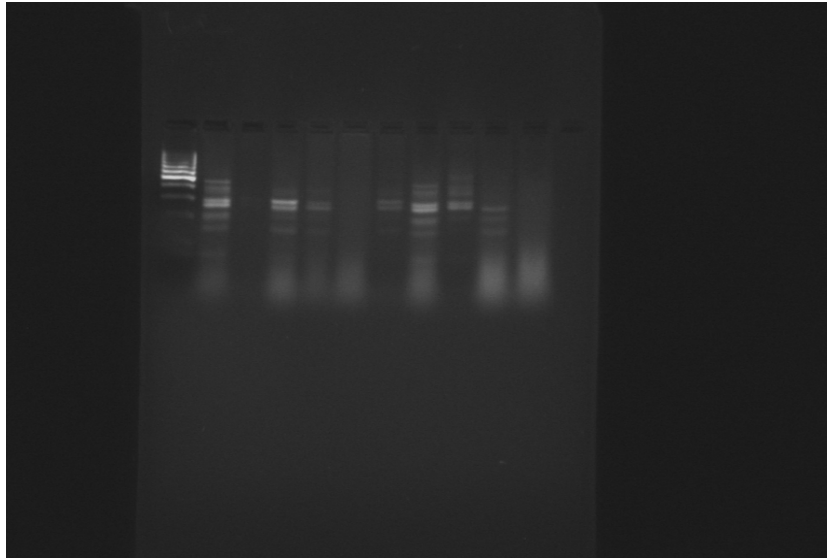


Рис. 1. Результат ампліфікації з праймером ISSR 4.

За результатами ампліфікації з використанням праймера ISSR 2 не було отримано жодного амплікону, що виключає застосування цього праймера в роботі з родом *Salix*.

Висновки. За результатами дослідження представників роду *Miscanthus* отримано 14 ISSR-локусів, з яких поліморфними є 13, що підтверджує популяційний склад модельної вибірки. Найбільшу кількість поліморфних локусів отримано за використання праймера ISSR 4 для генотипів видів *M. sacchariflorus*, *M. giganteus*, *M. sinensis*. Диференційовано представників роду *Miscanthus* різних видів за різницею в кількості отриманих алелей для

кожного представника. Виявлена кількість ампліконів для представників групи *M. giganteus* підтверджує його гібридне походження.

У результаті ампліфікації із ISSR праймерами для рослин роду *Salix* було виявлено 12 локусів з відсотком поліморфізму 60. Праймер ISSR 4 може бути використаний для диференці-

ації представників роду *Salix*, адже виявив амплікони з довжиною 570 і 720 п.н. з частотою 0,2, які зустрічаються у двох зразках – клон верби шведський та верба шерстистопагінцева. Цей праймер може бути використано для диференціації представників роду *Salix*. Отже, використання цих праймерів для селекційної практики дає змогу провести оцінювання генетичного різноманіття наявних видів роду *Miscanthus* та роду *Salix* для встановлення базових даних про рівні видового поліморфізму, що дає змогу спрогнозувати її ефективність. Оцінювання рівня поліморфізму також необхідно для паспортизації перспективних видів та генотипів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Альтернативні джерела енергії. URL: <http://www.kazedu.kz/referat/161223>
2. Розвиток та застосування різних видів біоенергетики / Талавиря М.П. та ін. Ніжин. 2012.
3. Dawson M. Some aspects of the development of short-rotation coppice willow for biomass in Northern Ireland. *Biological Sciences*. 1992. Vol. 98. P. 193–205.
4. Кудря С.О. Нетрадиційні та відновлювані джерела енергії. Київ, НТУУ «КПІ». 2012.
5. Zub H.W., Brancourt-Hulmel M. Agronomic and physiological performances of different species of

Miscanthus, a major energy crop. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2010. Vol. 30. No 2. P. 201–214. DOI: 10.1051/agro/2009034

6. Гелетуха Г.Г., Железна Т.А., Трибой О.В. Перспективи вирощування та використання енергетичних культур в Україні. Аналітична записка БАУ № 10. Біоенергетична асоціація України, 2014. URL: www.uabio.org/activity/uabio-analytics

7. MISCANTHUS / Міскантус. URL: http://c-13.herbs.on-planet.net/MISCANTHUS_Miskantus.htm.

8. Міскантус. URL: http://www.tsvetnik.info/lawn/lawn_Miskantus.htm.

9. Зінченко В.О. Мискантус – джерело енергетичної біомаси. Новини агротехніки. 2008, № 3. 40 с.

10. Новая форма мискантуса китайского (веерника китайского *Miscanthus sinensis* Anders.) как перспективный источник целлюлозосодержащего сырья / Шумный В.К. и др. Вестник ВОГиС. 2010, Т. 14, № 1. С. 122–126.

11. Зінченко О.В. Біохімічні особливості рослин *Miscanthus giganteus* в умовах полісся України. Агропромислове виробництво. Полісся. 2015. Вип. 8. С. 127–129.

12. Щербакова Т.О. Інтродукція видів та сортів роду *Miscanthus* Anders. в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України. Вісті біосферного заповідника «Асканія-Нова». 2012. № 14. С. 309–313.

13. Роїк М.В., Гонтаренко С.М., Лашук С.О. Сучасний стан розвитку селекції та реєстрації представників роду *Miscanthus* в Україні та світі. Збірник наукових праць Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків. Київ. 2014. Вип. 21. 249 с.

14. Hodkinson T.R., Chase M.W., Renvoize S.A. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany*. 2002. Vol. 89. P. 627–636. DOI: 10.1093/aob/mcf091

15. Cesare M.D., Hodkinson T., Barth S. Chloroplast DNA markers (cpSSRs, SNPs) for *Miscanthus*, *Saccharum* and related grasses (Panicoidae, Poaceae). *Molecular Breeding*. 2010. Vol. 26. P. 539–544. DOI: 10.1007/s11032-010-9451-z

16. Мискантус (*Miscanthus*) URL: <http://ladybee/flowers/plant/125/6695>.

17. Афонін О.О., Фучило Я.Д. Генетичний потенціал верби прутовидної (*Salix viminalis* L.) середнього подесення. Науковий вісник національного університету біоресурсів і природокористування України. Лісівництво та декоративне садівництво. 2012. Вип. 171(1). С. 11–19. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnu_lis_2012_171%281%29_3

18. Trybush S. Willow for Energy: Myths and Reality. Proc. of 8th International Conference on Biomass for Energy, 25–26 September 2012. Kyiv, Ukraine.

19. Cichorz S., Goska M., Litwiniec A. *Miscanthus*: Genetic Diversity and Genotype Identification Using ISSR and RAPD Markers. *Molecular Biotechnology*. 2014. Vol. 56. P. 911–924. DOI: 10.1007/s12033-014-9770-0.

20. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду *Beta* L. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції: методичні рекомендації / Роїк М.В. та ін. Київ. ПоліграфКонсалтинг, 2007. 27 с.

21. Сиволап Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: науч.-метод. руководство. К.: Аграрна наука, 1998. 70 с.

REFERENCES

1. Al'ternatyvni dzherela energiyi [Alternative Energy Sources]. Available at: <http://www.kazedu.kz/referat/161223>

2. Talavyria, M.P., Baranovska, O.D., Dobrivska, M.V., Zhovnodyi, A.V., Melnik, Z.Yu. (2012). Rozvytok ta zastosuvannya rizny'x vydiv bioenergetyky [Development and application of different types of bioenergy]. Nizhy'n.

3. Dawson, M. (1992). Some aspects of the development of short-rotation coppice willow for biomass in Northern Ireland. *Biological Sciences*. Vol. 98, pp. 193–205.

4. Kudrya, S.O. (2012). Netrady'cjni ta vidnovlyuvani dzherela energiyi [Unconventional and renewable energy sources]. Kyiv, NTUU «KPI».

5. Zub, H.W., Brancourt-Hulmel, M. (2010). Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. Vol. 30, (2), pp. 201–214. DOI: 10.1051/agro/2009034

6. Geletukha, G.G., Zheluzna, T.A., Triboy, O.V. (2014). Perspektyvy vy'roshhuvannya ta vy'korystannya energetychny'x kul'tur v Ukraini [Prospects for growing and using energy crops in Ukraine]. *Analitychna zapy'ska BAU № 10. Bioenergetychna asociaciya Ukrainy* [UAB analytical note №10. Bioenergy Association of Ukraine]. Available at: www.uabio.org/activity/uabio-analytics

7. MISCANTHUS / Miskantus. Available at: http://c-13.herbs.on-planet.net/MISCANTHUS_Miskantus.htm.

8. Miskantus. Available at: http://www.tsvetnik.info/lawn/lawn_Miskantus.htm.

9. Zinchenko, V.O. (2008). Miskantus – dzherelo energetychnoyi biomasy [Miscanthus is a source of energy biomass]. *Novy'ny' agrotexnyky* [Agricultural news], no. 3, 40 p.

10. Shumnyj, V.K., Veprev, S.G., Nechiporenko, N.N., Goryachkovskaya T.N. (2010). Novaya forma miskantusa kitajskogo (veernika kitajskogo *Miscanthus sinensis* Anders.) kak perspektivnyj istochnik cellyulozoder-zhashchego syr'ya [A new form of Chinese miscanthus (Chinese fan *Miscanthus sinensis* Anders.) as a promising source of cellulose-containing raw materials]. *Vestnik VOGiS* [VOGiS Bulletin]. Vol. 14, no. 1, pp. 122–126.

11. Zinchenko, O.V. (2015). Bioximichni osoblyvosti rosly'n *Miscanthusgiganteus* v umovax polissya Ukrainy [Biochemical features of *Miscanthusgiganteus* plants in the woodland of Ukraine]. *Agropromy'slove vy'robny'cztvo* [Agro-industrial production]. Polissya, no. 8, pp. 27–129.

12. Shcherbakova, T.O. (2012). Introdukciya vidiv ta sortiv rodu *Miscanthus* Anders. v Nacional'nomu botanichnomu sadu im. M.M. Grishka NAN Ukraini [Introduction of species and varieties of the genus *Miscanthus* Anders. in the National Botanical Garden. M.M. Grishka NAS of Ukraine]. *Visti biosfernogo zapovidnika «Askaniya-Nova»* [News of the Askania-Nova Biosphere Reserve], no. 14, pp. 309–313.

13. Royik, M.V., Gontarenko, S.M., Lashuk, S.O. (2014). Suchasny'j stan rozvytku selekciyi ta reyestraciyi predstavny'kiv rodu *Miscanthus* v Ukraini ta sviti [The current state of development of selection and registration of representatives of the genus *Miscanthus* in Ukraine and the world]. *Zbirny'k naukovy'x prac' Instytutu bioenergetychny'x kul'tur i czukrovy'x buryakiv* [Collection of scientific works of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beets]. Kyiv, no. 21, 249 p.

14. Hodkinson, T.R., Chase, M.W., Renvoize, S.A. (2002). Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany*. Vol. 89, pp. 627–636. DOI: 10.1093/aob/mcf091

15. Cesare, M.D., Hodkinson, T., Barth, S. (2010). Chloroplast DNA markers (cpSSRs, SNPs) for *Miscanthus*, *Saccharum* and related grasses (Panicoidae, Poaceae). *Molecular Breeding*. no. 26, pp. 539–544. DOI: 10.1007/s11032-010-9451-z

16. *Miscanthus* (*Miscanthus*) Available at: <http://ladybee/flowers/plant/125/6695>.

17. Afonin, O.O., Fuchy'lo, Ya.D. (2012). Genetychny' potentsial verby' prutovy' dnoyi (*Salix viminalis* L.) seredn'ogo podesennya [Genetic potential of willow (*Salix viminalis* L.) of medium descent]. *Naukovy'j visnyk nacional'nogo universy'tetu bioresursiv i pry'rodokory'stuvannya Ukrainy*. *Lisivny'ctvo ta dekoratyvne sadivny'ctvo* [Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Forestry and ornamental horticulture], no. 171(1), pp. 11–19. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnau_lis_2012_171%281%29_3

18. Trybush, S. Willow for Energy: Myths and Reality. Proc. of 8th International Conference on Biomass for Energy, 25–26 September 2012. Kyiv, Ukraine.

19. Cichorz, S., Goska, M., Litwiniec, A. (2014). *Miscanthus*: Genetic Diversity and Genotype Identification Using ISSR and RAPD Markers. In *Molecular Biotechnology*. Vol. 56, pp. 911–924. DOI: 10.1007/s12033-014-9770-0.

20. Royik, M.V., Sy'volap, Yu.M., Petyux, G.P. (2007). Vy'znachennya molekulyarno-genetychnogo polimorfizmu rodu *Beta L.* za dopomogoyu polimeraznoyi lancyugovoyi reakciyi: metodychni rekomendacii' [Determination of molecular genetic polymorphism of the genus *Beta L.* using polymerase chain reaction]. Kyiv, PoligrafKonsalty'ng, 27 s.

21. Sy'volap, Yu.M. (1998). Y'spol'zovany'e PCR-analyza v genetyko-selekcyyonnykh y'sledovany'ax: nauch.-metod. rukovodstvo [The use of PCR analysis in genetic selection studies]. Kyiv, Agricultural science, pp. 8–70.

Изучение полиморфизма по ISSR маркерам представителей биоэнергетических культур родов *MISCANTHUS* и *SALIX*

Бабьяж А.И., Чередничок О.И., Григоренко Н.А.

Целью работы является анализ генома представителей мискантуса и ивы энергетической, которые входят в коллекцию ИБКЦБ НААН Украины, методом ISSR - PCR для оценки их генетического разнообразия и выявления уровня полиморфизма. Развитие биоэнергетики в мире и Украине побудило сельхозпроизводителей использовать культуры, которые ранее не были объектом их внимания, как биоэнергетические растения. В работе использованы классические лабораторные методы для проведения ПЦР анализа, а именно выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции (ISSR-анализ), электрофоретическое распределение полученных ПЦР-продуктов в агарозном геле, статистический метод. Выделение ДНК проводили стандартным методом экстракции СТАВ. Тотальную ДНК выделяли из вегетативных органов, отдельно с каждого растения.

Для анализа молекулярно-генетического полиморфизма рода *Miscanthus* было использовано три праймера ISSR. В результате амплификации получено 14 локусов, 13 из которых оказались полиморфными. Индекс полиморфизма локуса колебался от 0,83 до 0,95. С помощью маркеров ISSR 2 и ISSR 4 обнаружено 100 % полиморфизм, поскольку 11 локусов, полученных с их участием, были полиморфными. Использование ISSR 1 позволило получить три аллеля: один аллель был обнаружен в *M. sinensis Andersson*, два – в *M. sacchariflorus (Maxim.) Franch.*, а три аллеля выявлено в *M. giganteus JM Greef*

& Deuter ex Hodkinson. Для анализа молекулярно-генетического полиморфизма рода *Salix* было использовано два праймера – ISSR 2 и ISSR 4. Установлено, что информативным является применение маркера ISSR 4, с помощью которого выявлено 7 ампликонов с показателем индекса полиморфности локуса 0,38, при частоте аллелей в пределах 0,2–0,8. Ампликоны с частотой 0,2 и длиной 570 и 720 п.н. встречаются в двух образцах: клон ивы шведский и ива шерстистопагинцева.

Наибольшее количество полиморфных локусов было получено с помощью праймера ISSR 4. Выявлено большое количество аллелей для *M. giganteus*, что подтверждает его гибридное происхождение. Также праймер ISSR 4 может быть использован для дифференциации представителей рода *Salix*, так как выявил ампликоны с длиной 570 и 720 п.н. с частотой 0,2, которые встречаются в двух образцах – клон ивы шведский и ива шерстистопагинцева, и его целесообразно использовать для дифференциации представителей рода *Salix*. Использование полученных данных позволяет оценить генетическое разнообразие существующих видов рода *Miscanthus* и *Salix* для более точной их детекции.

Ключевые слова: генотипы, род *Miscanthus*, род *Salix*, ISSR-полиморфизм, локусы.

Studying polymorphism through ISSR markers of the genus *Miscanthus* and *Salix* bioenergy cultures representatives

Babiazh A., Cherednychok O., Hryhorenko N.

The study aimed to analyze the genome of miscanthus and energy willow, which are included in the collection of Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet NAAS of Ukraine, by the ISSR – PCR method to assess their genetic diversity and identify the level of polymorphism. The development of bioenergy in the world and in Ukraine has prompted farmers to focus on using crops as bioenergy plants that that did not used to be the object of their attention. Classical laboratory methods for PCR analysis were used in the work, namely DNA isolation, polymerase chain reaction (ISSR analysis), electrophoretic distribution of the obtained PCR products in agarose gel, statistical method. DNA isolation was performed by standard CTAB extraction method. Total DNA was isolated from vegetative organs, separately from each plant. Three ISSR primers were used to analyze the molecular genetic polymorphism of the genus *Miscanthus*. As a result of amplification, 14 loci were obtained, 13 of which were polymorphic. The locus polymorphism index ranged from 0.83 to 0.95. 100 % polymorphism was detected with the help of ISSR 2 and ISSR 4 markers, as 11 loci obtained with their participation were limorphic. The use of ISSR 1 allowed to obtain three alleles: one allele was found in *M. sinensis Andersson*, two alleles were found in *M. sacchariflorus (Maxim.) Franch.*, And three alleles were found in *M. giganteus JM Greef & Deuter ex Hodkinson*. Two microsatellite primers ISSR2 and ISSR 4 were used to analyze the molecular genetic polymorphism of the genus *Salix*. in the range of 0.2–0.8. That is, there are amplicons that are present in most samples. Amplicons with a frequency of 0.2 and a length of 570 and 720 bp are found in two samples. The largest number of polymorphic loci was obtained using primer ISSR 4. A large number of alleles for *M. giganteus* was detected, which confirms its hybrid origin. Also, the ISSR 4 primer can be used to differentiate members

of the genus *Salix*, because it found amplicons with a length of 570 and 720 bp. with a frequency of 0.2, which are found in two samples – Clone of the Swedish willow and Willow wool and it is advisable to use it to differentiate members of the genus *Salix*. The use of the obtained data allows to estimate the genetic diversity of existing species of the genus *Miscanthus* and *Salix* for more accurate detection.

Key words: genome, genus *Miscanthus*, genus *Salix*, ISSR polymorphism, loci.



Copyright: Баб'яж А.І., Чередничок О.І., Григоренко Н.А. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:

Баб'яж А.І.

Чередничок О.І.

Григоренко Н.А.

<https://orcid.org/0000-0002-0733-7680>

<https://orcid.org/0000-0002-3221-2775>

<https://orcid.org/0000-0001-7291-6331>