

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ІНЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “__” _____ 2026 р.

**ОЦІНКА ГЕНОМНОЇ МІНЛИВОСТІ СОМАКЛОНАЛЬНИХ ВАРІАНТІВ
TRITICUM SPELTA L. ПОКОЛІННЯ R₂ МЕТОДОМ IRAP**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія
Москаленко Наталії Сергіївни

Науковий керівник від кафедри
д-р біол. наук, ст. наук. співроб.,
Дворщенко К.О.

Робота виконана у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом ст. наук. співроб., канд. біол. наук Нітовської Ірини Олександрівни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАП	– 6-бензиламінопурин;
2,4-Д	– 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота;
дНТФ	– дезоксинуклеотидтрифосфати;
НОК	– нафтилоцтова кислота;
ПЛР	– полімеразно-ланцюгова реакція;
IRAP	– Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (поліморфізм, ампліфікований між ретротранспозонами);
ISSR	– Inter-simple sequence repeat (повтори між простими послідовностями);
LTR	– Long Terminal Repeat (довгі термінальні повтори);
MS	– Murashige and Skoog medium (середовище Мурасіге-Скуга);
RAPD	– Random Amplified Polymorphic DNA (випадково ампліфікована поліморфна ДНК);
RBIP	– Retrotransposon-based insertion polymorphism (поліморфізм вставки на основі ретротранспозонів);
SNP	– Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидний поліморфізм);
SSR	– Simple Sequence Repeat (повтори простих послідовностей).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Молекулярно-генетичні методи оцінки соматоклональної мінливості спельти	7
1.1. Загальні відомості про вид <i>Triticum spelta</i> L.	7
1.2. Соматоклональна мінливість.....	9
1.3. Молекулярні маркери на основі полімеразної ланцюгової реакції в генетичному аналізі рослин	13
1.3.1. ПЛР-маркери на основі поліморфізму ампліфікованих фрагментів ДНК.....	14
1.3.2. Ретротранспозонні ПЛР-маркери	17
1.3.3. Маркери одонуклеотидного поліморфізму	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	23
2.1. Використаний матеріал рослин	23
2.2. Праймери, використані у дослідженні	25
2.3. Умови проведення ПЛР.....	26
2.4. Проведення електрофорезу продуктів ампліфікації.....	27
2.5. Комп'ютерна обробка електрофореграм	27
РОЗДІЛ 3. Результати генетичного аналізу <i>T. spelta</i> та оцінка ДНК-поліморфізму регенерантів методом IRAP	28
3.1. Оцінка ефективності IRAP праймерів у генетичному аналізі <i>T. spelta</i>	28
3.1.1. Аналіз ДНК генотипів спельти за використання праймеру до ретротранспозону Sabrina	28
3.1.2. Аналіз вихідних генотипів спельти за використання праймеру до ретротранспозону Daniella.....	30

3.1.3. Використання праймерів до LTR ретротраспозонів Wilma, Nikita і Sukkula	31
3.1.4. Аналіз генотипів спельти за використання праймерів до ретротранспозонів Stowaway, Wis2 і Wham	33
3.2. Ефективність аналізу геному спельти за використання комбінації із двох різних IRAP праймерів	35
3.3. Оцінка поліморфізму ДНК у рослин-регенерантів спельти покоління R ₂ ...	39
ВИСНОВКИ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44
ДОДАТКИ	50

ВСТУП

Більш ніж десять тисячоліть пшениця слугує основою продовольчої та харчової безпеки і наразі вона посідає першість серед вирощуваних культур на планеті. У середньому зернові продукти забезпечують близько 45 % добової потреби людини в калоріях. Ця частка варіюється від близько 25 % у багатьох європейських країнах (наприклад, у Німеччині та Великій Британії) до близько 55 % у деяких країнах, що розвиваються (наприклад, в Індії) [1, 2].

Приблизно 90-95 % усього виробництва пшениці в світі припадає на пшеницю м'яку або пшениця звичайна (*Triticum aestivum* L.), а інша частина на тверду (*Triticum durum*) [3, 4]. Попри стабільне зростання виробництва та широке поширення, пшениця залишається вразливою до біотичних та абіотичних факторів, що становить значну загрозу для майбутнього сільського господарства. Це одна з причин чому науковці все більше цікавляться стародавніми зерновими культурами, зокрема спельтою (*Triticum spelta* L.), оскільки вона є найближчою родичкою звичайної пшениці. Хоча спельта поступається пшениці звичайній у врожайності (на 20–30 %), а її зерна з товстою оболонкою ускладнюють посів та обмолот, вона має кращу поживну цінність. Це є ще однією причиною зацікавленості в *T. spelta*, адже в світі зростає попит на їжу з високою харчовою цінністю. Також ця рослина стійка до хвороб, невимоглива до умов вирощування, може рости на бідних ґрунтах, добре переносить заморозки та здатна вільно гібридизуватися з тетраплоїдними та гексаплоїдними видами, що робить її перспективним об'єктом для органічного землеробства та біотехнологічних досліджень [4, 5].

Надання цінним сільськогосподарським видам рослин корисних ознак є важливим елементом в селекції і біотехнології, де важливу роль відіграє явище соматональної мінливості. Створення нових рослин з кращими ознаками є

важливою частиною біотехнології і важлива в цьому роль припадає на соматоклональну мінливість, яка є джерелом генетичного різноманіття [6]. Цей підхід неодноразово демонстрував свою ефективність у дослідженнях генетиків і селекціонерів [7, 8]. Однак, це явище майже не досліджено для *T. spelta*. У світі існує всього три роботи з отримання регенерантів спельти *in vitro* [9–11]. В одному з досліджень соматоклональну мінливість у регенерантів оцінювали з використанням інтер-простих повторюваних послідовностей (ISSR) та аналізу фракцій розчинних білків. За отриманими результатами встановлено гомогенність регенерантів спельти [11]. Водночас вивчення наступних поколінь соматоклонів спельти щодо проявів соматоклональної мінливості, зокрема за показниками продуктивності, не проводилося. Таким чином, ідея розширення біорізноманіття спельти та підвищення її продуктивності шляхом використання соматоклональної мінливості наразі не має аналогів у світовій практиці та є інноваційною.

Метою даної роботи було оцінити геномну мінливість самоклональних варіантів *T. spelta* покоління R₂ методом IRAP.

Відповідно до мети, поставлено наступні завдання:

1. Визначити праймери, гомологічні до кінцевих послідовностей ретротранспозонів, а також поєднання праймерів для інформативного дослідження геному спельти вихідних генотипів.
2. Охарактеризувати спектр продуктів ампліфікації ДНК за використання праймерів, ефективних для IRAP аналізу спельти.
3. Порівняти вихідні генотипи спельти за досліджуваними локусами.
4. Дослідити ДНК рослин-регенерантів спельти покоління R₂, отриманих у культурі незрілих зародків, на наявність поліморфізму у порівнянні з рослинами вихідних генотипів.

РОЗДІЛ 1

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ОЦІНКИ СОМАКЛОНАЛЬНОЇ МІНЛИВОСТІ СПЕЛЬТИ

1.1. Загальні відомості про вид *Triticum spelta* L.

Пшениця спельта (*Triticum spelta* L.) – один із найдавніших видів роду *Triticum*, культури якого тривалий час домінували на полях. Однак з XIX століття, після виведення низки сортів озимої пшениці без оболонки, посів спельти різко скоротився [4, 12].

Спельта належить до плівчастих видів пшениці та, подібно до м'якої пшениці, має гексаплоїдний геном із 42 хромосомами (формула A^uA^uBBDD), що зумовлює її тісну спорідненість із *Triticum aestivum* L. Для цієї культури характерні як ярі, так і озимі форми розвитку. Нерідко спельту помилково ототожнюють із полбою, однак це різні таксони: полба має тетраплоїдний геном AABB і 28 хромосом та використовується у виробництві значно рідше [13].

Походження спельти залишається дискусійним – за одними гіпотезами, вона виникла внаслідок спонтанних мутацій, за іншими є результатом складних процесів міжвидової або навіть міжродової гібридизації [13, 14].

Дедалі більше зростає попит на якісне харчування, чим приваблює до себе споживачів спельти. Вона відзначається підвищенням вмістом білка в зерні. Його рівень перевищує показники м'якої пшениці (*T. aestivum* L.) на 8,0–10,0 %, а *T. sphaerococcum* Persiv. – на 3,0–8,0 %. Окрім цього, містить широкий спектр поживних компонентів і амінокислот, частина яких відсутня у продуктах тваринного походження [14].

Зерно спельти багатше на цінні ліпіди та мінеральні елементи, зокрема характеризується підвищеним вмістом цинку, міді, заліза, магнію та фосфору, а також містить більше вітамінів і розчинної дієтичної клітковини. Крім того, воно вирізняється у 8–10 разів більшим вмістом резистентного крохмалю, підвищеною концентрацією антиоксидантів (зокрема фолатів, алкілрезорцинолів і фітостеролів) та переважає сучасні сорти пшениці за вмістом селену, дефіцит якого спричиняє такі серйозні захворювання, як хвороба Кешана, хвороба Кашина-Бека, ендемічний мікседематозний гіпотиреоз. Спельта вважається ефективним дієтичним продуктом при селенодефіциті та супутніх хворобах [15]. Наявність фітинової кислоти, яка здатна зв'язувати мінерали, зумовлює не лише їх значний вміст, а й кращу біодоступність [14].

Хоча спельта характеризується підвищеним вмістом клейковини на 16–20 %, у порівнянні з пшеницею м'якою, її глютен відрізняється від глютену м'якої пшениці відсутністю окремих фракцій гліадинів. Це робить її потенційно придатною для людей із підвищеною чутливістю до пшеничного білка та дозволяє використовувати у дієтичному харчуванні [14, 16].

Проте спельта приваблює не лише споживачів, а й селекціонерів завдяки стійкості рослини до патогенів, кращу адаптивність до несприятливих умов довкілля. Вона вирізняється низкою біологічних переваг, зокрема високою здатністю до кушіння, невибагливістю до умов вирощування та значною скловидністю зерна, яке не схильне до осипання і менш пошкоджується птахами та комахами. Також характеризується стійкістю до перезволоження, відносною скоростиглістю, а також високою холодо- й зимостійкістю. Порівняно із сучасними сортами пшениці, спельта менш чутлива до кліматичних коливань і зниження родючості ґрунтів [4, 14].

Водночас спельта поступається м'якій пшениці за рівнем урожайності, що значною мірою зумовлено складністю обмолоту її зерна. Наявний генофонд культури представлений переважно місцевими формами народної селекції, що

обмежує її конкурентоспроможність за продуктивністю порівняно з м'якою пшеницею. У зв'язку з цим одним із ключових напрямів селекційної роботи є створення нових сортів спельти з підвищеною врожайністю за збереження високого вмісту білка, мікроелементів, вітамінів і клейковини в зерні [16].

1.2. Сомаклональна мінливість

Термін «сомаклональна мінливість» уперше запропонували Ларкін і Скоукрофт у 1981 році для опису генетичних змін, що виникають у рослин, регенерованих із різних типів клітинних культур. У сучасному розумінні цим поняттям позначають варіабельність, яка спостерігається у клоновано розмножених рослин, отриманих від одного донора, і яка охоплює комплекс морфологічних, цитологічних, біохімічних, а також генетичних і епігенетичних змін [6].

У контексті розроблення стандартизованих протоколів мікророзмноження та/або створення комерційних плантацій економічно важливих культур соматоклональна мінливість становить суттєву проблему, оскільки в цих випадках необхідно суворо зберігати характеристики особин, відібраних для започаткування культур *in vitro*. Водночас це явище виступає джерелом генетичної різноманітності, яке може ефективно використовуватися селекціонерами для створення нових форм із покращеними господарсько цінними характеристиками, такі як стійкість до патогенів, гербіцидів, комах, толерантність до абіотичного стресу, висока врожайність та поліпшення якості зерна [6, 17, 18].

Соматоклональна мінливість переважно зумовлена новими мутаціями, що виникають у процесі культивування тканин. Їх поява пов'язана з дією різноманітних стресових чинників, серед яких механічні ушкодження, вплив

стерилізувальних агентів під час обробки експлантів, особливості вихідного матеріалу (зокрема використання протопластів як крайнього випадку), дисбаланс компонентів поживного середовища, включно з підвищеними концентраціями регуляторів росту (ауксинів і цитокінінів), наявність цукру як замітника фотосинтетичної активності, а також специфічні умови освітлення і порушене співвідношення між високою вологістю та транспірацією [19].

Значна частка варіабельності, що спостерігається у мікроклонально розмножених рослин, може бути наслідком окиснювального стресу, який виникає під час культивування *in vitro*. Такий стрес спричиняє накопичення прооксидантів або активних форм кисню, які здатні індукувати епігенетичні зміни, такі як порушення метилювання ДНК, а також викликати структурні перебудови геному: варіації числа хромосом (від поліплоїдії до анеуплоїдії), розриви та реорганізацію хромосом, делеції й заміни нуклеотидів. У результаті це може призводити до виникнення мутацій у клітинах рослин, культивованих *in vitro* [19].

Є три основних фактори, що впливають на соматоклональну мінливість. Це генотип, джерело експланту та умови культивування [18, 19].

Перше це генотип. Генетичні особливості рослин, що використовуються для соматоклональної мінливості, є важливою змінною. Саме генотип може впливати як на ефективність регенерації, так і частоту появи соматоклональних варіантів [18].

Другий фактор це джерело експлантів. Походження експлантів розглядають як одну з ключових змінних, що впливають на прояв соматоклональної мінливості. Різні типи тканин можуть зумовлювати відмінності як у характері виникнення варіацій, так і в їх частоті. Високо диференційовані тканини (корені, листки, стебла), зазвичай дають більше варіацій, ніж експланти з уже існуючими меристемами, такими як пазушні бруньки та верхівки пагонів. Загалом, чим старша та/або більш спеціалізована тканина, що використовується

для регенерації, тим більша ймовірність, що варіація буде відтворена у регенерованих рослинах. У таких випадках формування придаткових пагонів (органогенез) може відбуватися з нетипових ділянок – безпосередньо або через стадію калюсу (наприклад, із листків, черешків, міжвузлів, сегментів коренів, пиляків, гіпокотилів, сім'ядоль тощо) [18].

Джерелом соматоклональної мінливості можуть бути також соматичні мутації, які вже наявні в донорській рослині, зокрема у вигляді химерних тканин в експлантах [18].

Відомо, що зовнішні фактори суттєво впливають на клітинний цикл рослин *in vitro*, що свідчить про те, що недостатній контроль клітинного циклу *in vitro* є однією з причин соматоклональної мінливості [19]. Регулятори росту рослин можуть впливати на швидкість соматоклональної мінливості як прямо, так і опосередковано, через збільшення швидкості розмноження та індукуючи придаткові пагони. Деякі регулятори росту, такі як 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д), нафтилооцтова кислота (НОК) та 6-бензиламінопурин (БАП), синтетичні похідні фенілсечовини, найчастіше вважаються відповідальними за генетичну мінливість [19]. Згідно систематичному огляду про роль соматоклональної мінливості в селекції рослин [17] одним з методів індукції соматоклональної мінливості є використання фіторегуляторів, де найчастіше використовували БАП та 2,4-Д. БАП – це цитокінін, який використовується для регулювання росту та розвитку рослин *in vitro*. Другим за частотою використання регулятором росту в процесах культури калюсу був 2,4-Д, оскільки одна з функцій 2,4-Д це участь в калюсогенезі, що є важливим процесом для опосередкованого отримання рослин [16]. Тривале культивування в середовищі, що містить 2,4-Д, впливає на підвищення рівнів плоїдності ДНК у клітинах калюсу [19].

На виникнення варіацій *in vitro* впливає не лише концентрація, а й співвідношення різних регуляторів росту. Згідно з Corpes [20], баланс між

ауксинами та цитокінінами може безпосередньо впливати на процес формування та розвитку калюсу. Припускається, що при високих концентраціях ауксинів відбувається утворення коренів, при низьких концентраціях цитокінінів відбувається утворення адвентивних бруньок, а проміжне співвідношення цих регуляторів призводить до утворення калюсів [19, 20].

Узагальнюючи, створення соматоклональних варіантів у рослин має низку переваг. По-перше, це відносно простий, швидкий і економічно вигідний спосіб отримання нових форм порівняно з традиційною селекцією, що особливо важливо для багаторічних культур із тривалим вегетаційним періодом [6, 17, 18]. По-друге, варіабельність виникає з доволі високою частотою, що вигідно відрізняє цей підхід від класичного мутагенезу. По-третє, метод придатний для видів із обмеженим генетичним різноманіттям і не потребує детального знання їхнього геному. Крім того, він дає змогу індукувати нові господарсько цінні ознаки, зокрема стійкість до хвороб, патотоксинів, гербіцидів і різних біотичних та абіотичних стресів. Важливою перевагою є також можливість отримання форм із підвищеним синтезом біологічно активних метаболітів, у тому числі з фармакологічною цінністю [6, 18]. На додачу, системи тканинної культури доступні для більшої кількості видів рослин, ніж ті, якими на даний час можна маніпулювати за допомогою соматичної гібридизації та трансформації [18].

Водночас соматоклональна мінливість має низку обмежень. Насамперед, вона носить випадковий характер, що ускладнює прогнозування результатів, а також має недостатню відтворюваність, навіть попри встановлені чинники, що впливають на її прояв. Крім того, значна частина генетичних змін пов'язана з точковими мутаціями або хромосомними перебудовами, тому рослини покоління R_1 часто демонструють сегрегацію. Це ускладнює добір за кількісними ознаками (наприклад, урожайністю), де в поколінні R_1 практично неможливо надійно виділити покращені форми [6, 18].

Хоча за допомогою соматоклональної мінливості створено окремі нові сорти, у більшості випадків перспективні варіанти не були впроваджені через те, що варіації часто супроводжуються небажаними ознаками, такими як знижена фертильність, уповільнений ріст або низька регенераційна здатність, можливе поєднання корисних ознак із небажаними. Соматоклональні варіанти не є новими генотипами, тому їх часто доводиться перевіряти на новизну, а генетичні зміни під час регенерації відбуваються з різною частотою, не є стабільними та не успадковуються. Окрім цього утворення соматоклональних варіантів обмежується лише тими рослинами, які мають здатність розмножуватися в культурі та регенеруватися у цілі рослини [6, 18, 21].

1.3. Молекулярні маркери на основі полімеразної ланцюгової реакції в генетичному аналізі рослин

Маркери на основі ПЛР належать до молекулярних маркерів другого покоління, розроблених для зменшення витрат часу, зусиль і ресурсів під час молекулярного картування та генотипування. Вони базуються на виявленні поліморфізмів послідовностей ДНК шляхом ампліфікації цільових ділянок, причому ці відмінності відображаються у складі та характеристиках отриманих продуктів ПЛР. До різних видів маркерів цього типу, які будуть висвітлені в цьому підрозділі, належать: випадково ампліфікована поліморфна ДНК (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), повтори простих послідовностей (SSR), повтори між простими послідовностями (ISSR), ретротранспозонні ПЛР-маркери (IRAP, REMAP, RBIP, IPBS), одонуклеотидний поліморфізм (SNP) [22-24].

Варто зазначити що молекулярні маркери можна поділити на кодомінантні та домінантні. Кодомінантні молекулярні маркери дозволяють чітко розрізняти

гомозиготні та гетерозиготні особини завдяки візуалізації смуг різних алелей на електрофоретичному гелі. На противагу їм, домінантні маркери фіксують лише наявність або відсутність смуги, через що гомозиготні домінантні та гетерозиготні форми виглядають ідентично [24].

1.3.1. ПЛР-маркери на основі поліморфізму ампліфікованих фрагментів ДНК

Маркери випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD) широко застосовуються для аналізу генетичного різноманіття та попереднього генотипування. Принцип ґрунтується на ампліфікації випадкових ділянок геномної ДНК за допомогою коротких довільних олігонуклеотидних праймерів (зазвичай 8–15 нуклеотидів). У реакції використовується один праймер, який може приєднуватися до кількох комплементарних ділянок геному, унаслідок чого одночасно ампліфікуються кілька фрагментів ДНК [24, 25].

Поліморфізм RAPD проявляється у вигляді наявності або відсутності ампліфікованих смуг і зумовлений змінами у сайтах зв'язування праймерів (мутації, інсерції або делеції), а також відстанню та орієнтацією цих ділянок у геномі. Успішна ампліфікація можлива лише за умови, що два сайти гібридизації розташовані на відповідній відстані й орієнтовані назустріч один одному. Внаслідок цього різні генотипи формують специфічні електрофоретичні профілі, які використовують для оцінки генетичної варіабельності. Водночас RAPD-маркери є домінантними, тому не дозволяють розрізняти гомозиготні та гетерозиготні стани алелів [24, 25].

До основних переваг методу належать простота виконання, швидкість аналізу, відносно низька вартість і потреба в невеликій кількості ДНК. Крім того, відсутня необхідність у розробці специфічних зондів або попередньому

знанні нуклеотидної послідовності, що робить RAPD зручним для дослідження маловивчених геномів. Однак метод має і деякі обмеження. Найважливішими з них є низька відтворюваність результатів, висока чутливість до умов ПЛР, а також складність інтерпретації електрофоретичних профілів через можливу ко-міграцію фрагментів однакової довжини. Додатково короткі праймери можуть спричиняти неспецифічну ампліфікацію, що знижує точність аналізу. Та попри зазначені недоліки, RAPD залишається корисним інструментом для швидкої оцінки генетичної різноманітності та первинного скринінгу [24, 25].

Повтори простих послідовностей (SSR), також відомі як мікросателіти або VNTR (variable number tandem repeats), – це тандемні повтори коротких нуклеотидних мотивів довжиною від 1 до 6 пар основ. Вони широко поширені, є поліморфними та хаотично розподіленими по всьому ядерному, хлоропластному (cpSSR) та мітохондріальному (mtSSR) геномах більшості еукаріотів [24, 25].

Поліморфізм SSR-маркерів виникає внаслідок варіації кількості повторів мотиву між особинами. Це є результатом кросоверів та генних невідповідностей у процесі репарації дволанцюгових розривів, які не вдається виправити механізмами репарації невідповідностей (Mismatch Repair, MMR). Також від ефективності системи MMR залежить стабільність таких ділянок. Якщо механізми MMR не виправляють помилку, відбувається розширення або скорочення повторної ділянки [24, 25].

Локуси SSR є локус-специфічними. Їх виявляють за допомогою ПЛР-ампліфікації, використовуючи, на відміну від аналізу RAPD або ISSR, пару праймерів, що приєднуються до консервативних фланкуючих ділянок. Оскільки фланкуючі послідовності стабільні в межах виду, SSR є надійними інструментами для картування та популяційних досліджень [24, 25].

Головною перевагою SSR є їхня кодомінантність, що дозволяє чітко розрізняти гомозиготні та гетерозиготні стани. Вони потребують невеликої

кількості ДНК (яка не обов'язково має бути високої якості), мають високу відтворюваність та значну алельну різноманітність. Проте, розробка нових SSR-маркерів є трудомістким і дорогим процесом, оскільки потребує попереднього знання послідовності ДНК для проектування специфічних праймерів. Також у деяких випадках ці маркери неможливо використовувати для міжвидових порівнянь через специфічність фланкуючих ділянок [24, 25].

Маркери повторів між простими послідовностями (ISSR), використовується для аналізу генетичного різноманіття, картування геному та дослідження філогенетичних зв'язків. Вони базуються на ампліфікації ділянок ДНК, розташованих між двома сусідніми мікросателітними повторами, які є ідентичними за послідовністю, але орієнтовані у протилежних напрямках [24, 25].

У методі ISSR зазвичай застосовується один довгий праймер (приблизно 15–30 нуклеотидів), який містить повторюваний мотив і може бути «закріпленим» 1–4 додатковими нуклеотидами на 3'- або 5'-кінці для підвищення специфічності. Такий праймер гібридується з кількома ділянками геному, що дозволяє одночасно ампліфікувати множинні фрагменти ДНК. Цей метод спрямований на варіацію довжини міжгеномної ділянки двох сусідніх простих послідовностей-повторів, які розсіяні та численні в більшості геномів [24, 25].

До переваг ISSR-маркерів належать відсутність потреби в попередній інформації про нуклеотидну послідовність, відносна простота виконання, економічність. Завдяки більшій довжині праймерів і вищим температурам відпалу (приблизно 45–60°C) цей метод характеризується кращою відтворюваністю порівняно з RAPD. Разом із тим ISSR-маркери мають певні недоліки. Вони є домінантними, тому не дозволяють розрізняти гомозиготні та гетерозиготні стани. Водночас важливою умовою є використання ДНК високої якості та стандартизація її кількості в реакції для забезпечення стабільності

результатів. Крім того, можлива ко-міграція фрагментів однакової довжини, що ускладнює інтерпретацію електрофоретичних профілів. Незважаючи на це, ISSR залишаються ефективним і доступним інструментом для досліджень генетичної мінливості, особливо у випадках, коли відсутня детальна інформація про геном [24, 25].

1.3.2. Ретротранспозонні ПЛР-маркери

Ретротранспозони є найпоширенішими мобільними генетичними елементами у рослин та в еукаріотів загалом [24]. Зокрема, у геномі кукурудзи їх частка становить приблизно 49–78 %, тоді як у пшениці близько 90 % ДНК представлено повторюваними послідовностями, з яких близько 68 % припадає на мобільні генетичні елементи [26]. Ретротранспозони з довгими термінальними повторами (LTR-RT) вважають найпоширенішими мобільними генетичними елементами в геномах рослин і транспонуються за допомогою РНК-посередників. Їх активність пов'язана з процесами генетичної рекомбінації, змінами плоїдності геному, підвищенням адаптивних властивостей рослин і стимуляцією еволюційних перетворень [27]. Стресові чинники такі, як поранення, дія патогенів, присутність різних речовин, а також культивування *in vitro*, здатні викликати активацію ретротранспозонів, що може призводити до виникнення мутацій або зміни рівня експресії генів. Підвищення активності ретротранспозонів за дії стресів свідчить про значну роль цих елементів у формуванні відповіді на дію стресових чинників [26].

Завдяки значній кількості копій, високій гетерогенності послідовностей і поліморфізму сайтів інтеграції LTR-ретротранспозони є гарними мішенями для створення молекулярних маркерів [27].

IRAP (Міжретротранспозонний ампліфікований поліморфізм) – це метод молекулярного маркування, який передбачає ампліфікацію геномної ДНК, що розташована між сусідніми послідовностями ретротранспозонів [28, 29]. Під час проведення аналізу IRAP фрагменти ДНК, розташовані між двома сусідніми LTR ретротранспозонів, виокремлюють методом ПЛР за допомогою праймерів, що зв'язуються з 3' кінцями послідовностей LTR [24].

Продукт ПЛР ампліфікації ДНК є стабільним генетичним маркером IRAP. Поліморфізм у цьому випадку виникає або внаслідок мутацій у сайтах зв'язування праймерів, або через специфічний механізм ретротранспозиції – вбудовуванням ретротранспозона в нову ділянку геному без втрати початкового місця [29]. Перевагами використання аналітичного методу IRAP є одночасний аналіз багатьох анонімних локусів у різних частинах геному, а також здатність виявляти геномні зміни, зокрема ті, що індуковані стресовими факторами. Таким чином, варіабельність спектрів міжретротранспозонних послідовностей може розглядатися як об'єктивний критерій геномної мінливості [26, 29].

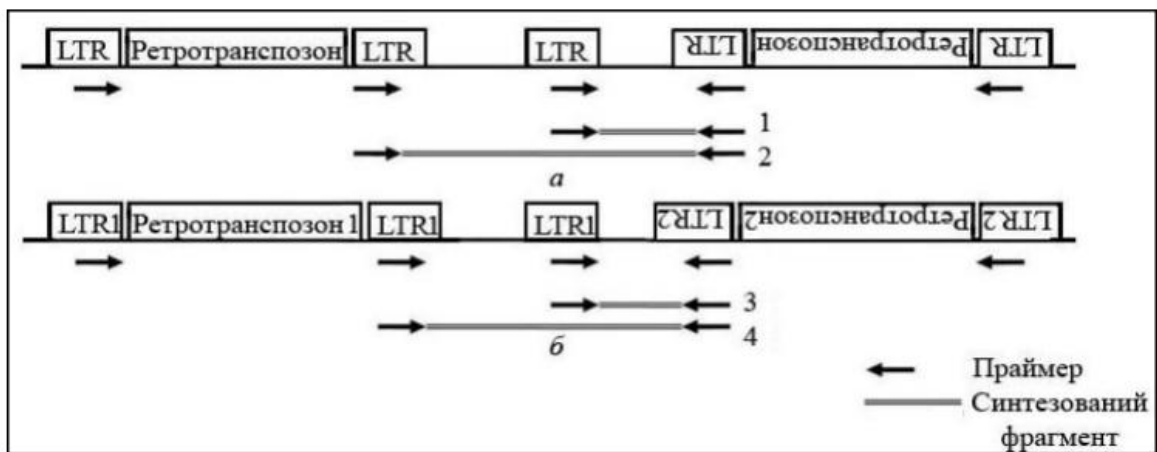


Рис. 1.1. Схема синтезу фрагментів ДНК (ампліконів) за використання одного (а) та комбінації двох (б) IRAP-праймерів [26, 30]

Метод IRAP широко застосовують для оцінювання генетичного різноманіття та встановлення спорідненості між популяціями, видами й сортами

[31-33]. Його також використовують для контролю стабільності геному, зокрема при перевірці генетичної однорідності рослин-регенерантів, отриманих у культурі *in vitro*, а також для оцінювання стану рідкісних видів [26]. Крім того, IRAP-аналіз ефективний при дослідженні трансгенних рослин, оскільки дозволяє виявляти геномні зміни, спричинені інтеграцією чужорідної ДНК (наприклад, у пшениці) [28-30]. Ретротранспозонові маркери використовувалися, наприклад, для оцінки геномної стабільності в популяціях молодого алополіплоїдного виду *Spartina anglica*, іранських сортів хлібної пшениці та селекційних ліній пшениці, а також для оцінки генетичного різноманіття та взаємозв'язків між видами та популяціями *Triticum* з Ірану [31, 33].

На відмінну від IRAP, поліморфізм, ***ампліфікований ретротранспозонами та мікросателітами (REMAP)*** заснований на ампліфікації ділянок ДНК між ретротранспозонами та мікросателітами [34]. Він являє собою домінантною та мультиплексною системою маркерів, які зручні для оцінки варіацій у місцях вставки ретротранспозонів [24].

В REMAP використовують праймери комплементарні до мікросателітів та праймери комплементарні до LTR ретротранспозонів. Вони розроблені таким чином, що ті праймери, які орієнтовані на локуси мікросателітів, містили послідовності, комплементарні до відповідного повторюваного мотиву, з 3'-кінцевим «якорем» з 2–4 нуклеотидів, щоб запобігти зміщенню праймера, що виникає внаслідок довільної гібридизації між мотивами мікросателітів [24, 35]. Якірний праймер також запобігає виявленню варіацій у кількості повторів у мікросателіті [35]. Мотиви SSR, які є численними в більшості геномів, здається, пов'язані з ретротранспозонами і спричиняють високі частоти мутацій через ковзання полімерази. Тому вони можуть бути більш ефективними локусами для генетичного різноманіття, аналізу структури, філогенії та генотипування рослин у межах виду або підвиду [35].

Поліморфізм вставних сайтів ретротранспозонів (RBIP) потрібен для дослідження вставки ретротранспозонів у будь-якій ділянці геному. В методі RBIP використовуються праймери, які комплементарних до ділянок LTR; до самого ретротранспозона та до послідовності прилеглої ДНК [24].

Маркер RBIP є локус-специфічним і класифікуються як кодомінантні. Поліморфізм у RBIP зазвичай виявляють за допомогою гель-електрофорезу або гібридизації, використовуючи відповідно агарозні або дот-аналізи. Основним обмеженням RBIP є необхідність інформації про послідовність ділянок, що фланкують місце вставки ретротранспозонів. Водночас до його переваг належать можливість автоматизації процесу та підвищення пропускну здатності аналізу завдяки застосуванню технологій, що не передбачають гелевого аналізу, таких як TaqMan™ або технологія ДНК-чипів [24].

Міжпраймерна ділянка зв'язування (IPBS) є методом, що дозволяє ампліфікувати геномні ділянки, розташовані між сайтом зв'язування праймерів (primer binding site, PBS) [36]. PBS зустрічається повсюдно у всіх послідовностях LTR-ретротранспозонів. PBS – це консервативні ділянки, що знаходяться в LTR ретротранспозонів і зазвичай розташовані поруч із 5'-послідовностями LTR. У LTR-ретротранспозонах комплементарні послідовності тРНК слугують місцем зв'язування праймерів зворотної транскриптази [24].

Перевагою методу IPBS полягає в тому, що не потрібне попереднє знання послідовності. Використовують IPBS-маркери для дослідження генетичного різноманіття та спорідненості різних видів рослин [24].

1.3.3. Маркери однонуклеотидного поліморфізму

Методи на основі ретротранспозонів дають можливість оцінити масштабні структурні перебудови, що є критично важливим для аналізу стабільності

геному в культурі *in vitro*. У той час як SNP дозволяють ідентифікувати точкові мутації в геномі, що є важливими для детального аналізу нуклеотидної варіабельності, виявлення алельних відмінностей та високоточної характеристики генетичних змін на рівні окремих позицій ДНК.

Однонуклеотидні поліморфізми (SNP) – це прості зміни однієї основи в послідовності [25]. Вони є найпоширенішою формою генетичного поліморфізму, що виникає внаслідок відмінностей у розташуванні окремих пар нуклеотидів у послідовностях ДНК. SNP локалізуються в кодуючих, некодуючих та міжгенних ділянках геномів з високою частотою – приблизно один маркер на кожні 100–300 пар нуклеотидів. Ці варіації є результатом мутацій і вважаються фундаментальною одиницею спадковості [24, 25].

Еволюція методів детекції SNP пройшла шлях від традиційного дидезоксисеквенування за Сангером до сучасних високопродуктивних технік. Хоча довгий час використовували переважно метод Сангера, його широке застосування обмежене через високу вартість, трудомісткість та неефективність у виявленні SNP у гетерозиготних матрицях. До технічно простіших альтернатив на основі ПЛР та електрофорезу в гелях належать методи CAPS (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів ампліфікованої ДНК), алель-специфічна ПЛР (AS-PCR) та SSCP (поліморфізм конформації одноланцюгових фрагментів). Проте використання гелів створює суттєві обмеження для досягнення високої пропускної здатності [24].

Сучасним рішенням для подолання цих труднощів є високопродуктивні технології, такі як секвенування наступного покоління (Next-Generation Sequencing, NGS), генотипування за допомогою секвенування (Genotyping-by-Sequencing, GBS) та NGS на основі мікросхем, що застосовуються для виявлення дуже інформативних SNP. Тому ці маркери стали найпривабливішими порівняно з багатьма іншими доступними молекулярними маркерами для генотипування [24].

Популярність SNP у молекулярній селекції рослин зумовлена їхньою біалельністю, стабільністю протягом багатьох поколінь та можливістю повної автоматизації процесу генотипування. Це дозволяє проводити масштабні дослідження генетичного різноманіття з високою точністю та швидкістю [24].

Пшениця спельта (*Triticum spelta* L.) — це стародавній гексаплоїдний вид, який відзначається високим вмістом білка, вітамінів та цінних мінеральних елементів. Завдяки біологічним перевагам, зокрема стійкості до патогенів, високій зимостійкості та адаптивності до несприятливих кліматичних умов, спельта є стратегічно важливим об'єктом для сучасної селекції та дієтичного харчування. Одним із перспективних шляхів отримання нових форм є використання соматоклональної мінливості — варіабельності, що виникає в процесі культивування *in vitro* під впливом стресу, генотипу та регуляторів росту. Хоча випадковий характер таких змін може бути проблемою для мікророзмноження, соматоклональні варіанти слугують джерелом нових господарсько цінних ознак, як-от підвищена врожайність чи стійкість до стресів. Для ідентифікації цих змін та аналізу геному застосовують молекулярні ПЛР-маркери, серед яких особливу роль відіграють ретротранспозонні методи, зокрема IRAP. Оскільки мобільні елементи становлять близько 68 % геному пшениці, маркери IRAP дають змогу оцінити генетичну мінливість, стабільність регенерантів та встановлювати спорідненість між генотипами.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Реактиви: очищена вода, праймери (Metabion, Німеччина), реакційний буфер В (Solis BioDyne, Естонія), хлорид магнію ($MgCl_2$), дезоксинуклеотидтрифосфати (дНТФ) (Thermo Fisher Scientific, США), ДНК полімераза FIREPol® (Solis BioDyne, Естонія), розчин сахарози, агароза (Cleaver Scientific, Великобританія), літій-боратний буфер (ЛБ), етидій бромід, маркер молекулярних мас (DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США)).

Обладнання: ампліфікатор Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf, Німеччина), система для очищення води Milli-Q (Millipore, США), система горизонтального електрофорезу (Cleaver Scientific, Великобританія), джерело УФ-світла Transilluminator 2011 Macrovue (LKB Bromma, Швеція) та фотоапарат Canon EOS 600D (Китай).

2.1. Використаний матеріал рослин

Для дослідів використовували насіння п'яти генотипів спельти — український сорт Зоря України, німецькі сорти *Zuricher Rotkorn* і *Filderweiss*, старовинний швейцарський сорт *Oberkulmer Rothkorn* та українська селекційна лінія *T. spelta* 4 (УК 4С/15) і 26 соматональних ліній цих генотипів покоління R_2 (дві лінії сорту Зоря України, п'ять ліній сорту *Zuricher Rotkorn*, одинадцять ліній сорту *Filderweiss*, дві лінії сорту *Oberkulmer Rothkorn* і шість ліній, отриманих від селекційної лінії УК 4С/15. Насіння вихідних генотипів

репродукції 2022 року було надано Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України.

Для отримання регенерантів спелти в культурі *in vitro* були використані середовища для калюсогенезу та регенерації. Для калюсогенезу використовували: середовище Мурасіге-Скуга (MS) 2,4-Д (модифіковане середовище MS, яке містило 2 мг/л 2,4-Д [37]) та mN6 (модифіковане середовище N6, яке містило 0,5 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л дикамби, та 0,1 мг/л абсцизової кислоти [38]). Отримані калюси переносили на чотири регенераційні середовища: 1) середовище MS без фітогормонів; 2) регенераційне середовище MS (MSR), [39] яке містило 1мг/л БАП та 0,1мг/л НОК; 3) MSBA [40], яке містило 3 мг/л БАП 4) RZ2, яке є модифікацією середовища MSGR [40] та містило 0,25 мг/л БАП. Загалом було протестовано 8 комбінацій живильних середовищ (рис. 2.1).

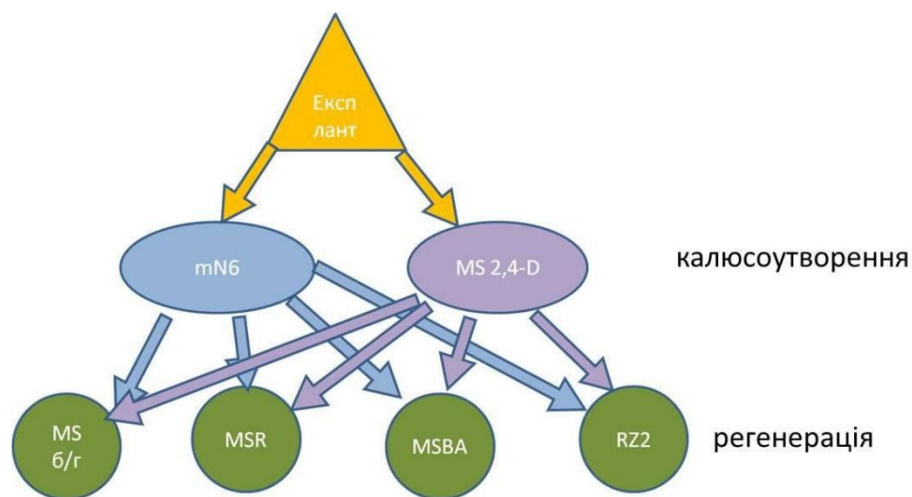


Рис. 2.1. Схема експерименту з використанням 8 комбінацій живильних середовищ

Після цього використовували середовище для укорінення, яке містило макро-, мікросолі середовища MS, вітаміни Мореля, 20 г/л сахарози, 100 мг/л гідролізату казеїну та 0,1 мг/л НОК.

2.2. Праймери, використані у дослідженні

У даному дослідженні використовували праймери, гомологічні до кінцевих послідовностей LTRs ретротранспозонів Sabrina, Daniella, Sukkula, Stowaway, Wham, Wilma, Nikita, Wis2 (табл. 2.1) [26, 28-30].

Таблиця 1.1

IRAP-праймери, використані в дослідженні

Праймер	Ретротранспозон	Нуклеотидна послідовність
Wis	Wis2	5'-TAATTTCTGCAACGTTCCCCAACA-3'
Wi	Wilma	5'-AGCATGATGCAAAATGGACGTATCA-3'
Da	Daniela	5'-TACCCCTACTTTAGTACACCGACA-3'
Wh	Wham	5'-GGAAAAGTAGATACGACGGAGACGT-3'
Ni	Nikita	5'-CGCTCCAGCGGTACTGCC-3'
Sa	Sabrina	5'-GCAAGCTTCCGTTTCCGC-3'
Su	Sukkula	5'-GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC-3'
St	Stowaway	5'-CTTATATTTAGGAACGGAGGGAGT-3'

2.3. Умови проведення ПЛР

До складу реакційної суміші для ПЛР, об'єм якої становив 20 мкл, входили: очищена, з використанням системи Millipore Milli-Q, вода; 10-кратний реакційний буфер В; 2 мМ $MgCl_2$; 0,2 мкМ дНТФ; 10 мМ праймери; 5 од/мкл ДНК полімерази FIREPol[®], 60 % розчин сахарози, та 10-30 нг досліджуваної ДНК. Матрична ДНК отримана з спелти за допомогою методу в якому використовувався цетилтриметиламоній бромід [41].

В моєму дослідженні використовувалися програма ампліфікації задана таким чином: початкова денатурація при 94°C 4 хв; 34 цикли (денатурація 94°C – 30 с, відпал 55°C – 1 хв, елонгація 72°C – 2 хв) та фінальна елонгація 72°C – 3 хв з наступним охолодженням до 22°C [26, 28-30].

2.4. Проведення електрофорезу продуктів ампліфікації

Розділення продуктів ампліфікації проводили у 2 %-му агарозному гелі за використання ЛБ буфера, протягом 1,5 години [42].

Потрібну кількість агарози зважували та переносили у термостійку скляну посудину, після чого додавали відповідний об'єм буферного розчину. Суміш нагрівали в мікрохвильовій печі до повного розчинення агарози. Отриманий розчин охолоджували до кімнатної температури під проточною водою, постійно перемішуючи. Як барвник застосовували етидій бромід у концентрації 0,1 мкг/мл.

Для герметизації плашок використовували гумові ущільнювачі, після чого встановлювали гребінки для формування відповідної кількості лунок.

Підготовлену суміш агарози заливали у форми та витримували за кімнатних умов до завершення процесу полімеризації. Після застигання гелю гребінки вилучали, а плашки розміщували в електрофоретичній камері. Важливо, щоб гель був повністю занурений в електродний буфер, після чого в кожну лунку вносили по 13 мкл досліджуваного матеріалу.

Для визначення розміру продуктів використовували ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix. Щоб візуалізувати амплікони у гелі використовували джерело УФ–світла та фотоапарат.

2.5. Комп'ютерна обробка електрофореграм

Розмір продуктів ПЛР визначали за допомогою програмного забезпечення GelAnalyzer 26.1.

Отримані знімки гелю були завантажені в програмне забезпечення з урахуванням певних коригувань щодо фону та різкості. Далі проводилось калібрування за допомогою маркеру молекулярних мас для якого у програмі задавали стандартні значення довжин у парах нуклеотидів (п.н.). Доріжки та смуги були автоматично виявлені програмним забезпеченням, а в разі необхідності було внесено корективи. Побудова калібрувальної кривої та оцінка молекулярної маси здійснювалася з використанням логарифму відносної електрофоретичної рухливості у порівнянні з розміром фрагмента [43].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ *T. SPELTA* ТА ОЦІНКА ДНК-ПОЛІМОРФІЗМУ РЕГЕНЕРАНТІВ МЕТОДОМ IRAP

3.1. Оцінка ефективності IRAP праймерів у генетичному аналізі

T. spelta

На початковому етапі дослідження необхідно було оцінити ефективність використаних праймерів та можливості їхнього застосування для аналізу геному спельти. З цією метою, відповідно до описаних методик, проводили ПЛР із кожним окремим праймером за використання ДНК рослин вихідних генотипів Зоря України (ЗУ), Zuricher Rotkorn (ZR), Filderweiss (Fw), Oberkulmer Rothkorn (OR) та селекційна лінія *T. spelta* 4 (S4).

3.1.1. Аналіз ДНК генотипів спельти за використання праймеру до ретротранспозону Sabrina

За використання праймеру до LTR ретротранспозону Sabrina спостерігали схожий спектр ампліконів для всіх досліджуваних генотипів спельти, водночас із деякими відмінностями (рис 3.1). Ми виявили наявність трьох ампліконів при аналізі ДНК всіх п'ятих генотипів – двох чітко виражених з приблизним розміром 1450 і 2000 п.н. та одного нечіткого з приблизним розміром 3500 п.н. Проте спектри ампліконів повністю співпадали тільки у сортів Filderweiss і Oberkulmer Rothkorn. Хоча варто зазначити, що інтенсивність амплікону з приблизним розміром в 2000 п.н. в смузї під номером 2 (українська селекційна лінія *T. spelta* 4) дещо вища, ніж відповідні амплікони інших генотипів, а відстань між двома чіткими ампліконами дещо менша.

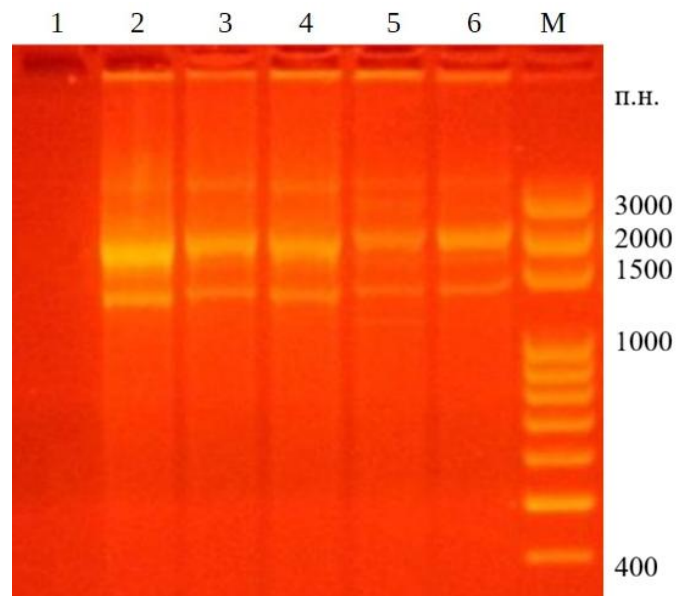


Рис. 3.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання праймера Sa: 1 – негативний контроль; 2 – селекційна лінія *T. spelta* 4; 3 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 4 – сорт Filderweiss; 5 – сорт Zuricher Rotkorn; 6 – сорт Зоря України; М – маркер молекулярних мас

У доріжках генотипів Зоря України і Zuricher Rotkorn ми спостерігаємо наявність двох додаткових ампліконів із слабкою візуалізацією з приблизним розміром 1800 і 3000 п.н., а також амплікон розміром 1300 п.н. для сорту Zuricher Rotkorn. Відстань між двома чіткими ампліконами з приблизним розміром 1450 і 2000 п.н. у спектрах останніх двох сортів спельти дещо більша, ніж у спектрах решти генотипів (рис. 3.1). Отже ми бачимо сильно схожі спектри продуктів ампліфікації для п'яти генотипів спельти, проте фіксуємо певні відмінності у спектрах за маркером Sa між генотипами, що може свідчити про наявність слабого поліморфізму. Ідентичними за локусом Sa є генотипи Filderweiss і Oberkulmer Rothkorn.

3.1.2. Аналіз вихідних генотипів спельти за використання праймеру до ретротранспозону *Daniella*

За використання праймеру Da ми візуалізували 5 ампліфікованих фрагментів ДНК у спектрах всіх досліджуваних генотипів спельти (рис. 3.2). І хоч той ампліконі, що мав приблизний розмір 4000 п.н. був менш чіткий порівняно з іншими, аналіз за цим локусом є високо інформативним.

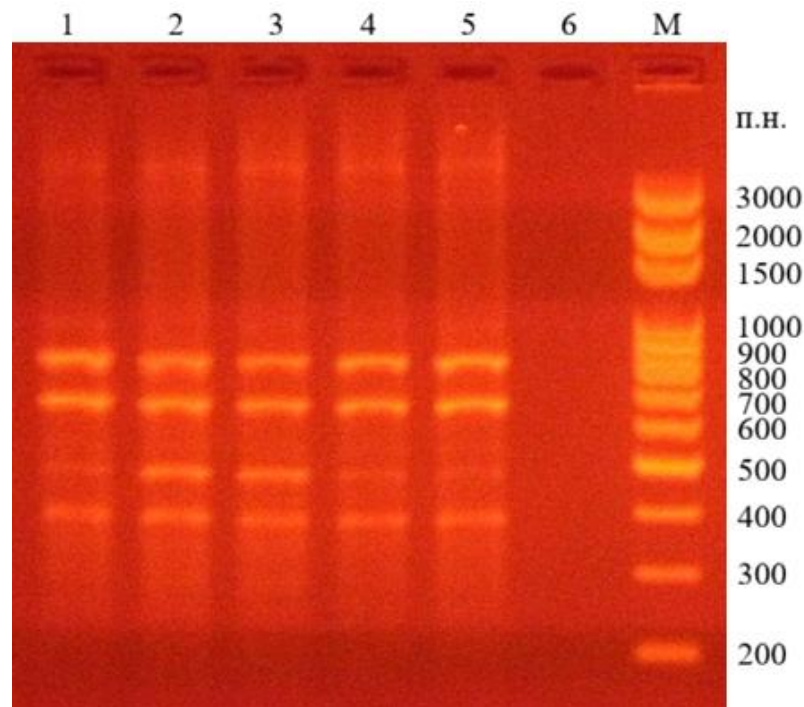


Рис. 3.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання праймера Da: 1 – сорт Зоря України; 2 – сорт *Zuricher Rotkorn*; 3 – сорт *Filderweiss*; 4 – сорт *Oberkulmer Rothkorn*; 5 – селекційна лінія *T. spelta*; 6 – негативний контроль; М – маркер молекулярних мас

Ми спостерігали ідентичні спектри продуктів ампліфікації для всіх вихідних генотипів, що свідчить про відсутність поліморфності за цим локусом

між сортами спельти. На основі отриманих даних можна стверджувати про ефективність праймера Da для аналізу генотипів спельти та його придатність для подальшого порівняльного аналізу вихідних форм і соматоклонів. Амплікони локалізувались в діапазоні від 400 до 4000 п.н. (див. рис. 3.2).

3.1.3. Використання праймерів до LTR ретротраспозонів Wilma, Nikita і Sukkula

При використанні праймера Wi (рис. 3.3) до LTR ретротраспозону Wilma (доріжки 1–6) спостерігали наявність чіткого амплікону з приблизним розміром 330 п.н. та сильне фононове забруднення у треках порівняно із негативним контролем, що свідчить про низьку ефективність та інформативність ампліфікації за використання цього праймеру. Основною причиною сильного фону ймовірно є висока копійність ретротранспозону Wilma у ДНК генотипів спельти. Якщо LTR-послідовності ретротраспозону дуже поширені в геномі та розташовані близько один до одного, ампліфікується величезна кількість фрагментів різної довжини, які зливаються у суцільний фон. Про це свідчить погана чіткість смуг ампліфікованої ДНК. Такий «фон» часто характерний для молодих або активних родин мобільних елементів. Вони часто вбудовуються в нові місця, створюючи хаотичний розподіл сайтів зв'язування.

Отже, праймер Wi непридатний для аналізу генотипів спельти за даних умов. Можна спробувати оптимізувати його використання через застосування технології Touchdown PCR, але навряд чи це зможе суттєво змінити ситуацію (рис. 3.3).

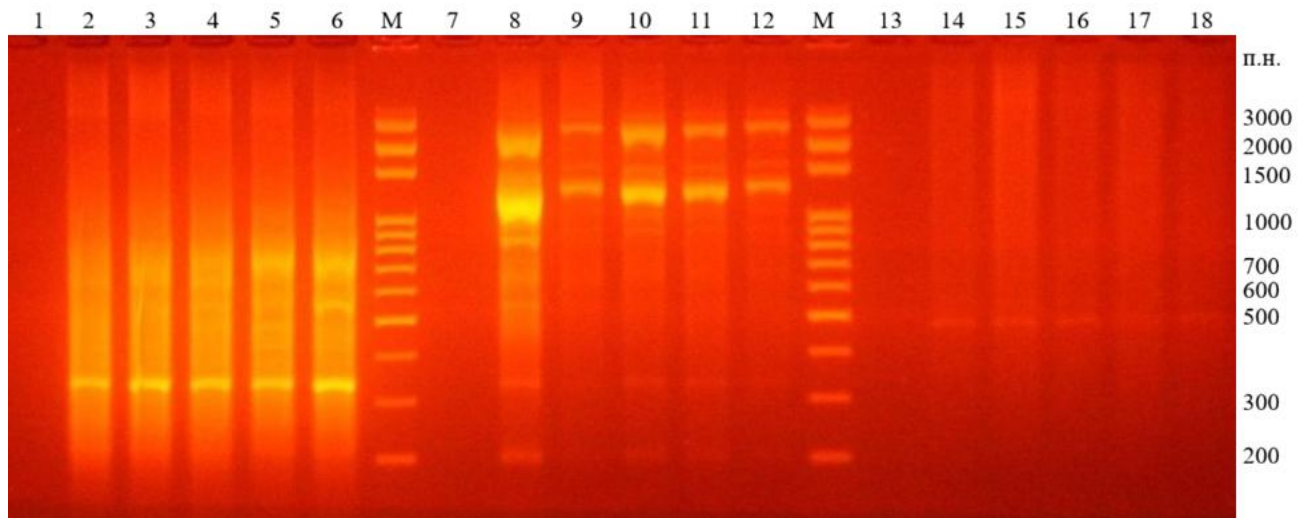


Рис. 3.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання праймера Wi (1 – негативний контроль; 2 – селекційна лінія *T. spelta* 4; 3 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 4 – сорт Filderweiss; 5 – сорт Zuricher Rotkorn; 6 – сорт Зоря України); праймера Ni (7 – негативний контроль; 8 – лінія *T. spelta* 4; 9 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 10 – сорт Filderweiss; 11 – сорт Zuricher Rotkorn; 12 – сорт Зоря України); праймера Su (13 – негативний контроль; 14 – лінія *T. spelta* 4; 15 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 16 – сорт Filderweiss; 17 – сорт Zuricher Rotkorn; 18 – сорт Зоря України); М – маркер молекулярних мас

На відміну від праймеру Wi, праймер Ni до LTR ретротраспозону Nikita (доріжки 8–12) є більш інформативним, оскільки за його використання у результаті ПЛР утворюються чіткі амплікони, які легко детектувати. Проте у доріжках гелю з продуктами ПЛР за використання праймеру Ni спостерігали також наявність нечітких смуг (рис. 3.3). Варто зазначити, що для різних генотипів виявляються відмінності у фрагментах ДНК, що свідчить про наявність поліморфізму між генотипами спельти. Сорти Зоря України, Zuricher Rotkorn, Filderweiss і Oberkulmer Rothkorn є мономорфні за цим локусом, тоді як українська селекційна лінія відрізняються від цієї групи генотипів.

У випадку праймера Su до LTR ретротраспозону Sukkula (доріжки 14–18) спостерігали лише один амплікон, який не є чітко вираженим (рис. 3.3). Отже, праймер Su має низьку інформативність для аналізу ДНК спельти. Можливо, родина ретротранспозонів Sukkula представлена в геномі одиничними копіями. За цим локусом вихідні генотипи були мономорфні.

3.1.4. Аналіз генотипів спельти за використання праймерів до ретротранспозонів Stowaway, Wis2 і Wham

За використання праймеру до ретротранспозону Wis2 спостерігали у гелі один амплікон приблизного розміру 4000 п.н. для всіх дослідних зразків ДНК без зайвого «фону» у доріжках (рис. 3.4). Схожу картинку спостерігали за використання праймера Su (рис. 3.3). Це свідчить про низьку копійність ретротранспозону Wis2 у геномі сельти. За цим локусом дослідні генотипи спельти були мономорфні. Оскільки розмір отриманого амплікону є достатньо великий (~ 4000 п.н.), при подальшому застосуванні цього праймеру у дослідженні ДНК спельти потрібно збільшувати час синтезу полінуклеотиду до 4 хв.

За використання праймеру Wh ми спостерігали високий «фон» у треках з дослідною ДНК порівняно з негативним контролем (доріжки 13–18) Це свідчить або про ймовірно високу копійність цього ретротранспозону у геномі спельти, або про неспецифічне з'єднання праймеру з іншими ділянками ДНК, а значить неефективність використання цього праймеру для аналізу геному спельти. Схожі результати ми отримали за використання праймеру Wi (рис. 3.3, доріжки 1-6). Відмінності між досліджуваними генотипами за локусом Wh не спостерігали (рис. 3.4).

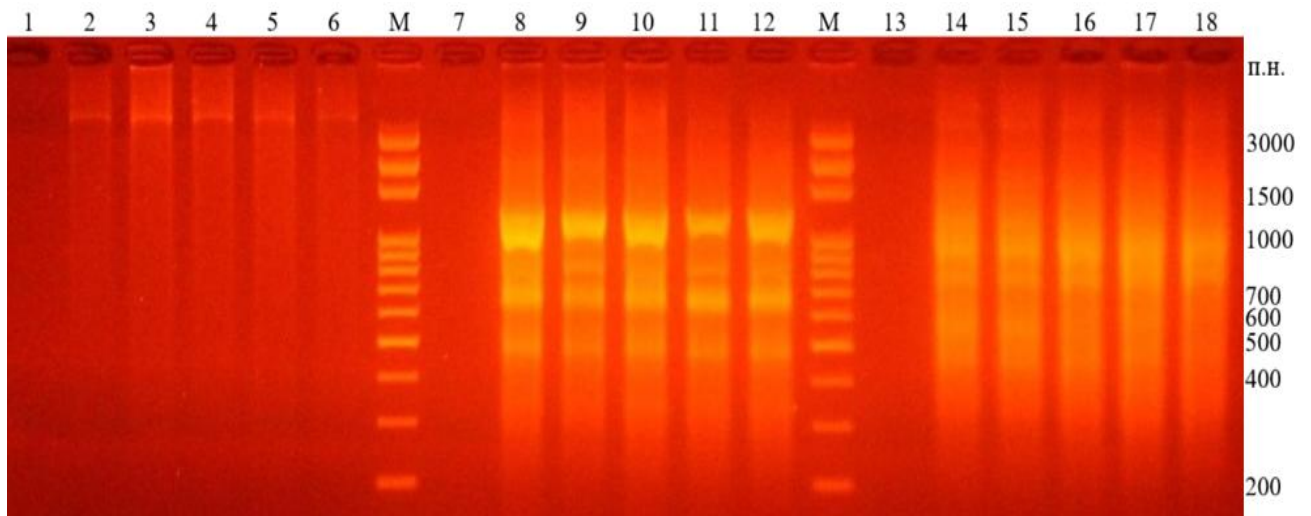


Рис. 3.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання праймера Wis (1 – негативний контроль; 2 – селекційна лінія *T. spelta* 4; 3 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 4 – сорт Filderweiss; 5 – сорт Zuricher Rotkorn; 6 – сорт Зоря України); праймера St (7 – негативний контроль; 8 – лінія *T. spelta* 4; 9 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 10 – сорт Filderweiss; 11 – сорт Zuricher Rotkorn; 12 – сорт Зоря України); праймера Wh (13 – негативний контроль; 14 – лінія *T. spelta* 4; 15 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 16 – сорт Filderweiss; 17 – сорт Zuricher Rotkorn; 18 – сорт Зоря України); М – маркер молекулярних мас

Використання праймеру до ретротранспозону Stowaway (доріжки 8–12) приводило до ампліфікації 4-ох ампліконів, які локалізувалися переважно в діапазоні приблизно 450–1500 п.н. При цьому спостерігали незначні відмінності у спектрах смуг між генотипами, що свідчить про наявність слабого поліморфізму. У сортів Zuricher Rotkorn і Oberkulmer Rothkorn спектр ампліконів слабо відрізнявся від такого решти генотипів (рис. 3.4).

3.2. Ефективність аналізу геному спельти за використання комбінації із двох різних IRAP праймерів

У попередніх дослідженнях для кращого виявлення поліморфізму серед рослин-регенерантів тритікале автори збільшили число досліджуваних локусів шляхом комбінування двох різних IRAP-праймерів при аналізі [26, 30]. У нашому дослідженні ми вирішили перевірити ефективність цього підходу для аналізу геному рослин спельти.

У дослідженні ми використовували різні комбінації праймерів, такі як Da/Su, Da/Sa, Sa/Wi, Sa/St, Sa/Ni (рис. 3.5, 3.6).

На рисунку 3.5 для обох комбінацій праймерів Da/Su і Da/Sa можемо спостерігати наявність великої кількості ампліконів, проте більшість з них є нечіткими. Варто зазначити, що у генотипів сортів Filderweiss та Zurich Rotkorn відмічали меншу кількість ампліфікованих фрагментів порівняно з іншими досліджуваними генотипами. Амплікони локалізуються в діапазоні приблизно 400–950 п.н.

Отже, якщо за використання окремо праймеру Da для IRAP аналізу генотипів спельти ми не спостерігали поліморфізму за генотипами, то використання комбінації двох IRAP праймерів дозволило виявити наявний поліморфізм. Проте комбінації праймерів Da/Su і Da/Sa поступаються в ефективності застосування праймеру Da через нечітку візуалізацію ампліконів (рис. 3.5).

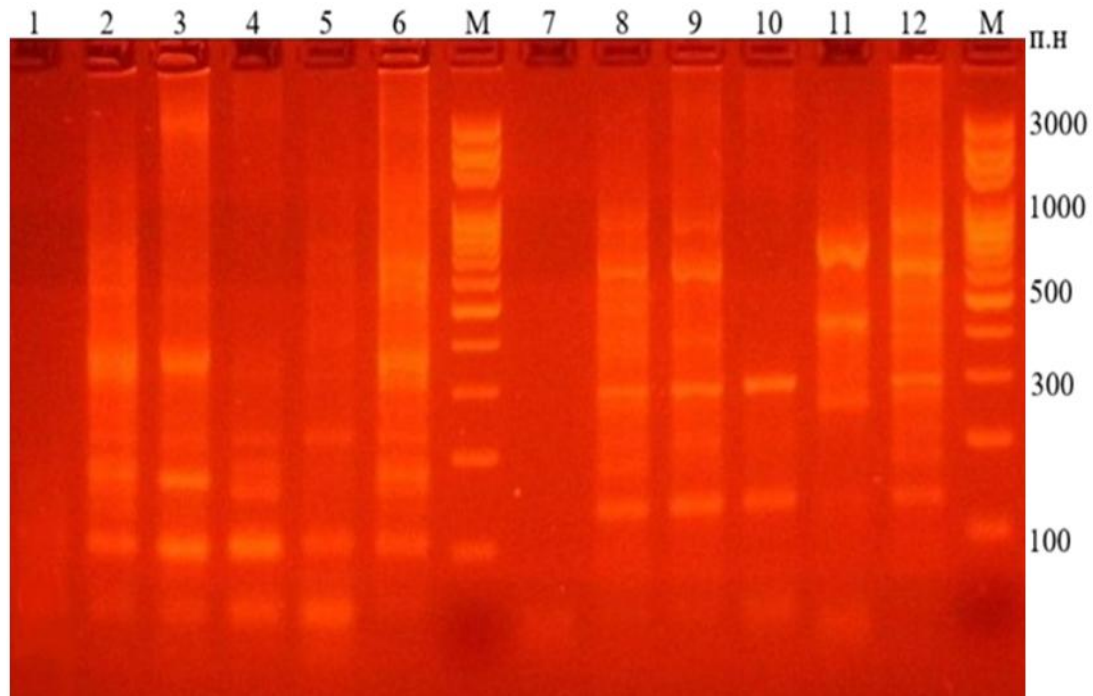


Рис. 3.5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання комбінації праймерів Da/Su (1 – негативний контроль; 2 – селекційна лінія *T. spelta* 4; 3 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 4 – сорт Filderweiss; 5 – сорт Zuricher Rotkorn; 6 – сорт Зоря України); праймери Da/Sa (7 – негативний контроль; 8 – лінія *T. spelta* 4; 9 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 10 – сорт Filderweiss; 11 – сорт Zuricher Rotkorn; 12 – сорт Зоря України); М – маркер молекулярних мас

На рис. 3.6 для комбінації праймерів Sa/Wi (доріжки 2–6) спостерігали 6 ампліфікованих фрагментів ДНК, проте лише 2 з них чіткі. Розмір ампліконів становив близько 200–800 п.н. Ми не спостерігали поліморфізму між генотипами за використання цієї комбінації праймерів.

У результаті застосування комбінація праймерів Sa/St (доріжки 8–12) ми отримали чотири амплікони у діапазоні розмірів приблизно 600–1500 п. н., що різнились за яскравістю у візуалізації. У результаті аналізу за допомогою цієї

комбінації праймерів ми не виявили поліморфізму між генотипами спельти (рис. 3.6).

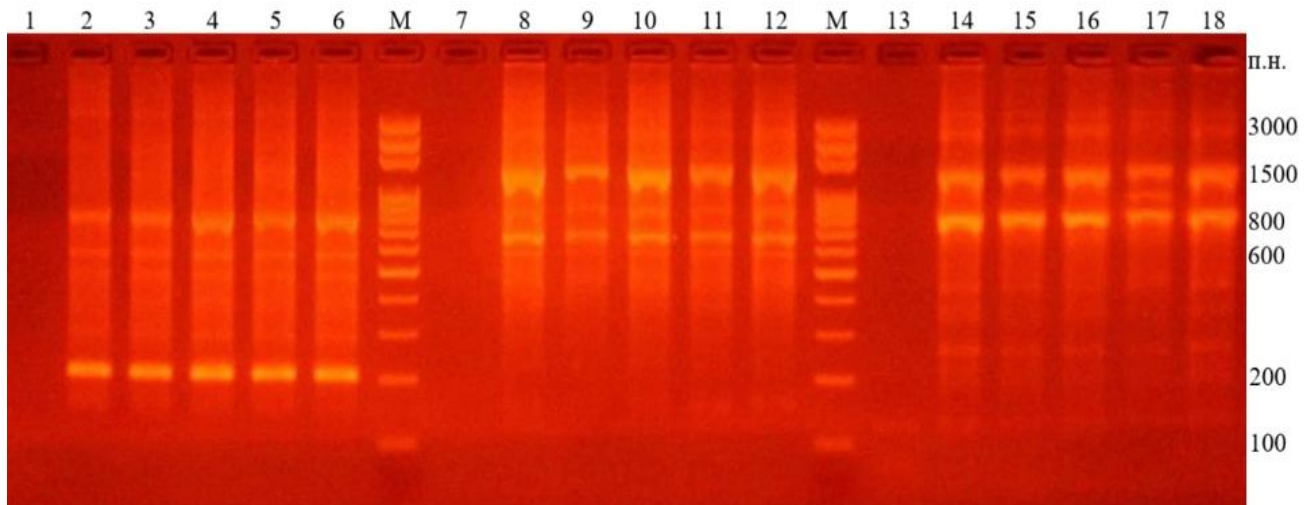


Рис. 3.6. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання комбінації праймерів Sa/Wi (1 – негативний контроль; 2 – селекційна лінія *T. spelta* 4; 3 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 4 – сорт Filderweiss; 5 – сорт Zuricher Rotkorn; 6 – сорт Зоря України); праймери Sa/St (7 – негативний контроль; 8 – лінія *T. spelta* 4; 9 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 10 – сорт Filderweiss; 11 – сорт Zuricher Rotkorn; 12 – сорт Зоря України); праймери Sa/Ni (13 – негативний контроль; 14 – лінія *T. spelta* 4; 15 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 16 – сорт Filderweiss; 17 – сорт Zuricher Rotkorn; 18 – сорт Зоря України); М – маркер молекулярних мас

За використання комбінації праймерів Sa/Ni (доріжки 14–18) отримано спектр із 9 ампліконів, два з яких чітко візуалізуються у гелі. Найбільш чіткі амплікони розташовані у діапазоні приблизно 700–3000 п.н. За спектром ампліконів сорт Zuricher Rotkorn відрізнявся від інших генотипів наявністю додаткового чіткого амплікону з приблизним розміром 1000 п.н. Також 2 чіткі ампліфіковані фрагменти ДНК, спектри смуг яких подібні (рис. 3.6).

Також було проаналізовано електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання комбінації праймерів Sa/Wh, Sa/Su, Su/Ni, Su/St, Su/Wh (Додаток А).

Комбінація праймерів Sa/Su показала наявність чітких продуктів ампліфікації, а загальна їх кількість становить 5–6 ампліконів, що свідчить про ефективність цієї комбінації праймерів. На нашу думку, праймер Sa у комбінації з іншими дає кращі результати для аналізу геному спельти, ніж коли використовувати його окремо.

В той час як інші комбінації праймерів були неефективними або слабо інформативними, за використання яких утворювалась мала кількість нечітких ампліконів, або спостерігали їх повну відсутність.

Отже, за характером отриманих спектрів продуктів ампліфікації ДНК можна виділити п'ять груп праймерів або комбінації праймерів:

- 1) високоефективні – праймери, за використання яких у спектрах продуктів ПЛР присутні три, або більше ампліконів, які можна чітко ідентифікувати;
- 2) середньо ефективні – праймери, за використання яких формувалося менше трьох ампліконів, які можна чітко ідентифікувати та характеризувались наявністю нечітких фрагментів.
- 3) слабо ефективні – праймери, за використання яких утворювались амплікони, які нечітко візуалізувались у гелі;
- 4) неефективні – праймери, за використання яких формувався один амплікон;
- 5) неробочі – праймери, за використання яких ПЛР не відбувалася.

До першої групи ми можемо віднести праймери Da, Sa, St, та комбінації праймерів Sa/Su. До другої – такі праймери та їх комбінації: Ni, Sa/Wi, Sa/St, Da/Sa, Sa/Ni. Варто додати, що на гелях з цими праймерами, окрім декількох чітких смуг, можна спостерігати від 5 загальної кількості ампліконів. Також, хоч за використання комбінації праймерів Da/Su формувалися нечіткі фрагменти, їх кількість становила більше чотирьох. Отже, попри те що ці праймери не є високоефективними, їх теж можна використовувати в подальших дослідженнях.

До третьої групи зараховуємо праймери: Wi, Wh, Da/Su, Su/St, Su/Wh. До четвертої – Su, Wis, а до п'ятої – комбінація праймерів Sa/Wh та Su/Ni.

У процесі дослідження було перевірено генетичну однорідність контрольних рослин за досліджуваними локусами. Для всіх високоефективних праймерів у зразках вихідних генотипів спостерігали практично ідентичні спектри продуктів ампліфікації з незначними відмінностями. Це свідчить про відсутність або мінімальний рівень поліморфізму у вихідному матеріалі за досліджуваними ділянками геному. Загалом кількість ампліфікованих фрагментів у вихідних рослинах варіювався від 1 до 7 фрагментів, а їх розмір становив від 140 до 4120 п.н. (Додаток Б).

3.3. Оцінка поліморфізму ДНК у рослин-регенерантів спельти покоління R₂

Наступним етапом роботи було дослідження ДНК рослин-регенерантів спельти покоління R₂, отриманих у культурі незрілих зародків, на наявність поліморфізму у порівнянні з рослинами вихідних форм. Для цього застосовували праймери, що показали свою ефективність на контрольних рослинах (рис. 3.7 – 3.9).

За допомогою стрілочок показано деякі зміни профілів ампліконів соматиклонів порівняно з вихідними генотипами. Генотипи сортів Зоря України та *T. spelta* 4 мають 8 ампліконів з розмірами 580, 765, 825, 1080, 1470, 2240, 2500, 3890, п.н. та 570, 755, 780, 980, 1100, 1260, 1550, 3890 п.н. відповідно (рис. 3.7). Ми можемо спостерігати втрату ампліконів для соматиклональних ліній № 7 та № 3 (доріжки 2, 3), а також для № 66, 28, 27, 15, 6 (доріжки 8, 12–13, 15–16).

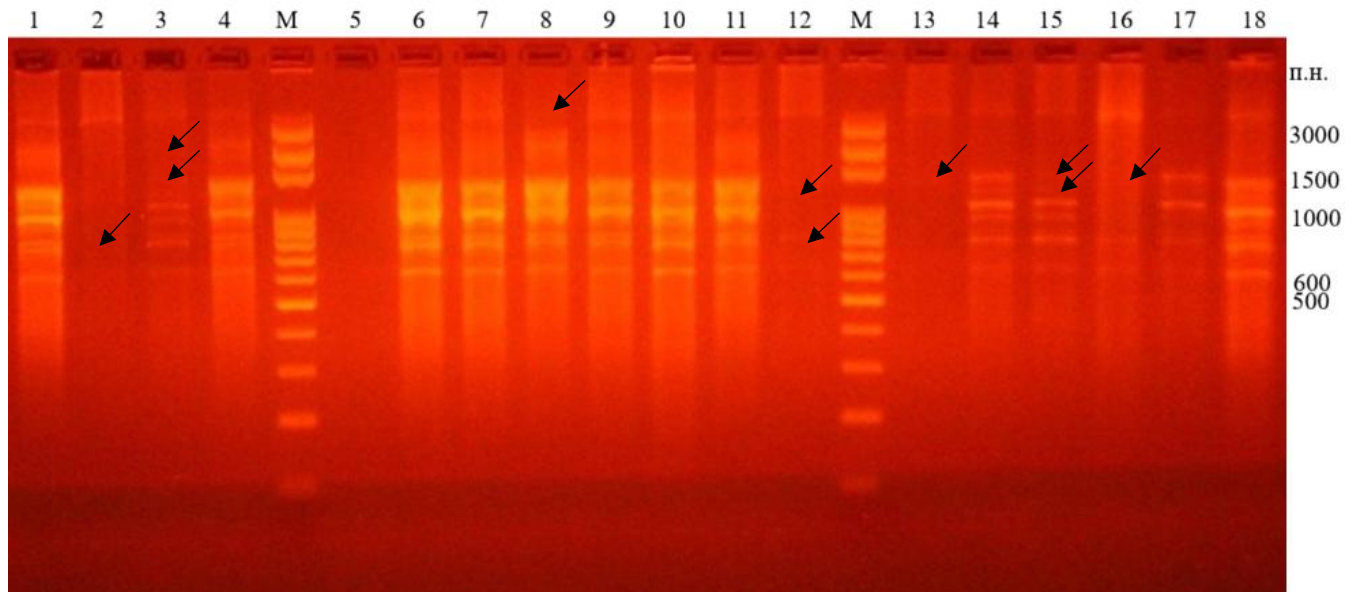


Рис. 3.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання праймера Da: 1–3 – соматоклональні лінії № 61, 7, 3; 4 – сорт Зоря України; 5 – негативний контроль; 6–17 – соматоклональні лінії № 84, 67, 66, 59, 44, 42, 28, 27, 22, 15, 6, 1; 18 – селекційна лінія *T. spelta* 4; М – маркер молекулярних мас

В лінії № 7 та № 27 було втрачено всі, окрім найбільшого за розміром, аплікони. В лінії № 3 було втрачено з 5 по 7 фрагменти (1470, 2240, 2500 п.н.). В лінії № 66 зник лише перший аплікон (3890 п.н.), тоді як в № 1, окрім першого, ще й 4 фрагмент (980 п.н.). В лініях № 6 та № 28 зникли з 4 по 7 послідовності продуктів ампліфікації (980 – 1550 п.н.). Окрім цього в лінії № 28, а також в № 22 та 15, було втрачено другий аплікон (755 п.н.) (рис.3.7).

На рис. 3.8 ми спостерігаємо зміни спектра ампліфікації у рослин-регенерантів лінії № 28. Порівняно з вихідним генотипом сорту *Zuricher Rotkorn* (620, 830, 1135, 1355 п.н.) виявлено, що перший та другий (620 і 830 п.н.) аплікони відсутні, тоді як інші змінили розмір і мають розмір фрагментів 1280 та 1765 п.н.

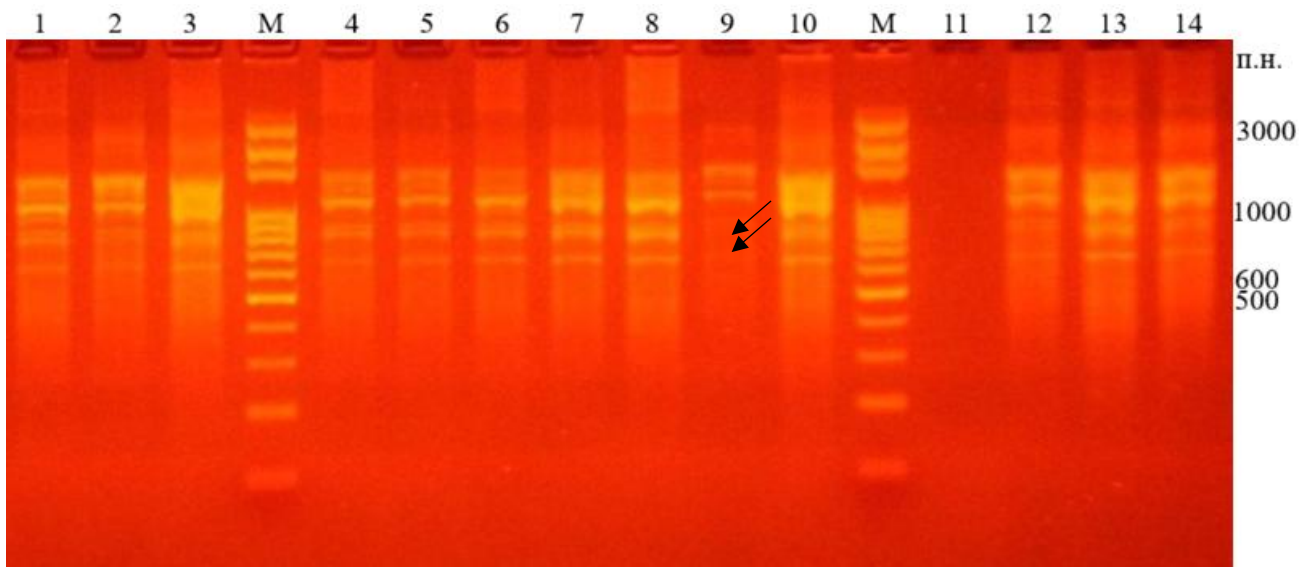


Рис. 3.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання праймера Da: 1 – 34; 2 – 29; 3 – генотип сорту Oberkulmer Rothkorn; 4–9 – соматоклональні лінії № 33, 32, 31, 30, 29, 28; 10 – генотип сорту Züricher Rotkorn; 11 – негативний контроль; 12–14 – соматоклональні лінії № 77, 72, 68; M – маркер молекулярних мас

Згідно рис 3.9 встановлено втрату ампліфікованих фрагментів для рослин-регенерантів лінії № 31, 30, 11, 7, 3. В вихідному генотипі сорту Züricher Rotkorn можна визначити наявність 7 ампліконів, а в генотипі сорту Зоря України – 8. В самоклональних лініях № 31, 30, 11 зникли фрагменти, що відповідали розміру 1155 п.н. та 1470 п.н. (№ 31) в генотипі сорту Züricher Rotkorn. В лініях № 7 та 3 були втрачені всі амплікони, крім найбільшого за розміром.

Отже, у ході дослідження було проаналізовано ефективність праймерів до ретротранспозонів та проведено їх класифікацію на чотири групи за характером отриманих спектрів ампліфікації. Окрім високоефективних маркерів, виявлено

ряд праймерів та їх комбінацій, які завдяки великій кількості ампліконів є перспективними для подальшого використання у генетичному аналізі.

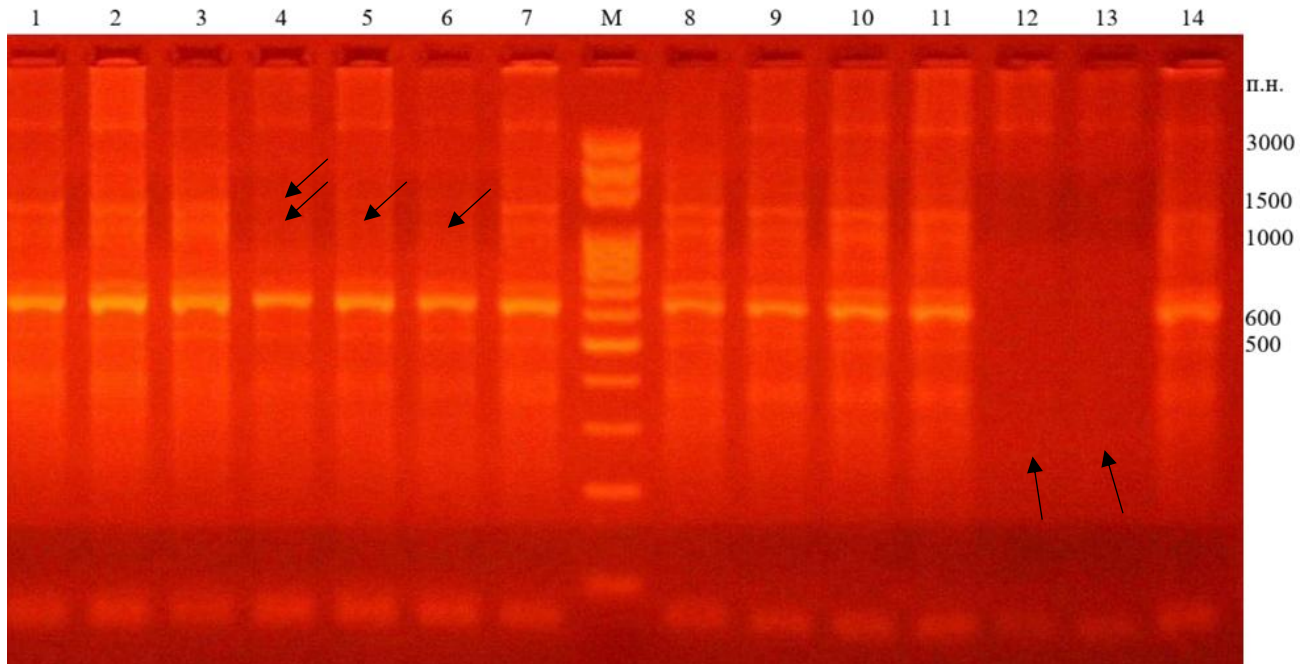


Рис. 3.9. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання комбінації праймерів Su/Sa: 1–6 – соматоклональні лінії № 39, 38, 36, 31, 30, 11; 7 – генотип сорту *Zuricher Rotkorn*; 8–13 – соматоклональні лінії № 77, 72, 68, 61, 7, 3; 14 – генотип сорту *Зоря України*; М – маркер молекулярних мас

Результати IRAP-аналізу свідчать про наявність молекулярно-генетичних змін у частини соматоклонів спельти, що вказує на переміщення транспозонів у геномі рослин. Такі переміщення здатні впливати на регуляцію експресії генів і, відповідно, проявлятися у вигляді соматоклональної мінливості за різноманітними ознаками [44], що ми і спостерігали у нашому дослідженні.

ВИСНОВКИ

У ході дослідження було визначено умови IRAP аналізу для молекулярно-генетичної характеристики генотипів спельти, встановлено інформативні праймери і їх комбінації для дослідження генетичної мінливості та встановлено наявність поліморфізму як між генотипами спельти, так і у ДНК рослин-регенерантів у порівнянні з рослинами вихідних форм. Отримані результати підтверджують ефективність застосування методу IRAP для виявлення генетичної мінливості у спельти та можуть бути використані для подальших досліджень соматоклональної варіабельності.

1. Оцінено ефективність праймерів для проведення IRAP аналізу геному спельти. Встановлено, що праймер Da та комбінація праймерів Sa/Su є найінформативнішими з усіх, оскільки забезпечують формування великої кількості чітких спектрів ампліфікованих фрагментів.

2. Визначено спектр продуктів ампліфікації ДНК спельти, який за використання праймерів становить від 1 до 7 фрагментів. Залежно від локусу, розмір отриманих ампліконів варіює у широкому діапазоні від 140 до 4120 п. н.

3. Встановлено, що при використанні різних праймерів у вихідних генотипів спельти за досліджуваними локусами спостерігаються як практично ідентичні спектри продуктів ампліфікації, так і ті, що виявляють поліморфізм між генотипами.

4. У рослин-регенерантів спельти покоління R_2 виявлено зміни спектрів ампліфікації ДНК порівняно з вихідними формами, що проявляються у втраті окремих ампліконів та зміні їх розмірів. Це свідчить про наявність генетичного поліморфізму, зумовленого структурними перебудовами геному.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Reynolds, M. and Braun, H.-J. (2022). *Wheat Improvement: Food Security in a Changing Climate*. Cham: Springer.
2. Wang, J., Chatzidimitriou, E., Wood, L., Hasanaliyeva, G., Markellou, E., Iversen, P., Seal, C., Baranski, M., Vigar, V., Ernst, L., Willson, A., Thapa, M., Barkla, B., Leifert, C. and Rempelos, L. (2020). Effect of wheat species (*Triticum aestivum* vs *T. spelta*), farming system (organic vs conventional) and flour type (wholegrain vs white) on composition of wheat flour. *Food Chemistry: X*, [online] Volume 6, 100091. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100091> [Accessed 30 June 2020].
3. *Wheat for bread and other foods* (no date) FAO. Available at: <https://www.fao.org/4/y4011e/y4011e0w.htm> (Accessed: 30 Apr. 2026).
4. Babenko, L., Hospodarenko, H., Rozhkov, R., Pariy, Y., Pariy, M., Babenko, A. and Kosakivska, I. (2018). *Triticum spelta*: Origin, biological characteristics and perspectives for use in breeding and agriculture. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2), pp. 250–257.
5. Nitovska, I., Panasenko, A., Redko, V., Zadorozhna, M. and Morgun, B. (2024). Determination of phosphinothricin and paromomycin selective concentrations for obtaining transgenic spelt plants. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 34, pp. 199–205.
6. Duta-Cornescu, G., Constantin, N., Pojoga, D.-M., Nicuta, D. and Simon-Gruita, A. (2023). Somaclonal Variation—Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 24(1), p. 838. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24010838> [Accessed 3 Jan 2023].

7. Ahmed, K. and Abdelkareem, A. (2005). Somaclonal variation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications*, 33, pp. 485–492.
8. Arun, B., Singh, B., Sharma, S., Paliwal, R. and Joshi, A. (2007). Development of somaclonal variants of wheat. *Field Crops Research*, 103(1), pp. 62–69.
9. Alikina, O., Chernobrovkina, M., Dolgov, S. and Miroshnichenko, D. (2016). Tissue culture efficiency of wheat species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16, pp. 307–314.
10. Ozgen, M., Birsin, M. and Benlioglu, B. (2017). Biotechnological characterization of wheat progenitors. *Plant Genetic Resources*, 15(1), pp. 45–50.
11. Kyriienko, A., Shcherbak, N., Kuchuk, M. Parii, M. and Symonenko, Y. (2021). In vitro plant regeneration from *Triticum spelta*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 57, pp. 856–863.
12. Poltoretskyi, S., Hospodarenko, H., Liubych, V., Poltoretska, N. and Demydas, H. (2018). Origin and distribution of *Triticum spelta*. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(2), pp. 263–268.
13. Моргун, В., Січкач, С., Починок, В., Нінієва, А. та Чугункова, Т. (2016). Характеристика зразків спельти. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(2), сс. 112–119.
14. Моргун, В., Радченко, О. та Дубровна, О. (2025). Пшениця спельта: біологічні властивості та господарське значення. *Фізіологія рослин і генетика*, 57(2), сс. 117–136.
15. *Selenium Fact Sheet for Health Professionals* (no date) *National Institutes of Health*. Available at: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/> (Accessed: 30 Apr. 2026).
16. Діордієва, І. (2018). Лінії пшениці спельти Уманського національного університету садівництва. *Генетичні ресурси рослин*, 23, сс. 32–39.
17. Ferreira, M., Rocha, A., Nascimento, F., Oliveira, W., Soares, J., Rebouças, T., Morais Lino, L., Haddad, F., Ferreira, C., Santos-Serejo, J., Fernández, J. and

- Amorim, E. (2023). The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review. *Agronomy*, [online] Volume 13(3), p. 730. Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy13030730> [Accessed 28 Feb. 2023]
18. Sivaji, M., Pandiyan, M., Yuvaraj, M., Suganyadevi, M., Thilagavathi, T. and Sasmitha R. (2022). Somaclonal Variation–Tool for Crop Improvement. *e Scientia Letters*, [online]. Available at: https://www.researchgate.net/publication/361051818_Somaclonal_Variation_-_Tool_for_Crop_Improvement [Accessed 1 Jul. 2022].
 19. Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M. and Sadh, R. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, [online] Volume 6(1), pp. 1–18.
 20. Corpes, R. and Santos, A. (2021). Growth regulators influence. *Research, Society and Development*, 10(12), pp. 1–19.
 21. *Propagation and Genetic Manipulation of Plants*. (2021). I. Siddique, ed. Singapore: Springer Nature.
 22. Mourad, A., Alomari, D., Alqudah, A., Sallam, A. and Salem, K. (2019). Recent Advances in Wheat (*Triticum spp.*) Breeding. In: J. Al-Khayri, S. Jain and D. Johnson, eds. *Advances in Plant Breeding Strategies: Cereals*. Cham: Springer. Ch. 28, pp. 559–593.
 23. Gigaulia, P., Sapre, S., Gontia, I., Chouksey, P., Gourav, S., Rathore, R. and Singh, M. (2025). Introduction to PCR and Molecular Markers. pp 95–121.
 24. Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, [online] Volume 7(10), e08093. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093> [Accessed 30 Sep. 2021]..
 25. Ramesh, P., Mallikarjuna, G., Shaik, S., Kumar, A., Gurulakshmi, K., Reddy, B., Puli, C. and Akila, C. S. (2020). Advancements in molecular marker technologies and their applications in diversity studies. *Journal of Biosciences*, 45(123), pp. 1–15.

26. Бавол, А., Великожон, Л., Пикало, С. та Дубровна, О. (2016). IRAP-аналіз рослин-регенерантів тритикале, стійких до водного дефіциту. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 19, сс. 73–78.
27. Chen, X., Chong, H., Wen, S., Min, Y., Leng, Y., He, Y., Wen, G. and Wen, X. (2025). Development of Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) Markers and DNA Fingerprinting of Blueberry Accessions. *Horticulturae*, [online] Volume 11(11), 1319. Available at: <https://doi.org/10.3390/horticulturae11111319> [Accessed 3 Nov. 2025].
28. Dubrovna, O., Velikozhon, L., Slivka, L., Kondratskaya, I., Reshetnikov, V. and Makai, S. (2020). Detection of dna polymorphism of transgenic wheat plants with proline metabolism heterologous genes. *Фізіол. росл. генет.*, 52(3), pp. 196–207.
29. Morgun, B. and Dubrovna, O. (2019). IRAP Analysis of Transgenic Wheat Plants with a Double-Stranded RNA Suppressor of the Proline Dehydrogenase Gene. *Cytol. Genet.*, 53, pp. 384–391.
30. Дубровна О., Гончарук, О. та Великожон, Л. (2017). IRAP-аналіз генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації in vitro. *Фізіологія рослин і генетика*, 49(2), сс. 110–119.
31. Badr, A., El-Sherif, N., Aly, S., Ibrahim, S. and Ibrahim, M. (2020). Genetic Diversity among Selected Medicago sativa Cultivars Using Inter-Retrotransposon-Amplified Polymorphism, Chloroplast DNA Barcodes and Morpho-Agronomic Trait Analyses. *Plants*, [online] Volume 9(8), 995. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants9080995> [Accessed 5 Aug. 2020].
32. Kalendar, R., Flavell, A., Ellis, T. Sjakste, T., Moisy, C. and Schulman A. (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*, 106, pp. 520–530.
33. Eslami, A., Khodayari, H., Saeidi, H. and Rahiminejad, M. (2015). Genetic diversity of diploid Triticum species in Iran assessed using inter-retroelement amplified polymorphisms (IRAP) markers. *Biologia - Section Botany*, 70, pp. 52-60.

34. Leśniowska-Nowak, J., Okoń, S. and Wieremczuk, A. (2021). Molecular diversity analysis of genotypes from four *Aegilops* species based on retrotransposon–microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers. *Cereal Research Communications*, 49, pp. 37-44.
35. El Zayat, M., Hassan, A., Nishawy, E., Ali, M. and Amar, M. (2021). Patterns of genetic structure and evidence of Egyptian Citrus rootstock based on informative SSR, LTR-IRAP and LTR-REMAP molecular markers. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, [online] Volume 19(1), 29. Available at: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00128-z> [Accessed 10 Feb.2021].
36. Kutsokon, Y., Popovych, Y., Chebotar, S., Bakuma, A., Yuryshynets, V. and Kvach, Y. (2024). Inter-primer Binding Site Markers (iPBS) are Used to Describe the Genetic Diversity of Populations of the Black-striped Pipefish *Syngnathus abaster* Risso, 1827 (Actinopterygii: Syngnathidae) in their Natural and Expansion Ranges in Ukraine. *Acta Zoologica Bulgarica*, 76, pp. 301-307.
37. Бавол, А., Дубровна, О. та Лялько, І. (2007). Регенерація рослин із експлантів верхівки проростків пшениці. *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*, 5(1), сс. 3-10.
38. Нітовська, І., Абраїмова, О., Дуплій, В., Деркач, К., Сатарова, Т., Рудас, В., Черчель, В., Дзюбецький, Б. та Моргун, Б. (2019). Використання транз'єнтної експресії гена бета-глюкуронідази для відбору генотипів кукурудзи, компетентних до генетичної трансформації. *Цитологія та генетика*, 53(6), сс. 15–25.
39. Nitovska, I., Avilov, I. and Morgun, B. (2015). The positive effect of antibiotic paromomycin compared with kanamycin for selection of transgenic plants with nptII gene on the example of *Nicotiana tabacum*. *Factors in experemental evolution of organisms*, 17, pp. 270-273.

40. Sidorov, V. and Duncan, D. (2009). *Agrobacterium*-Mediated Maize Transformation: Immature Embryos Versus Callus. In: M. Scott, ed. *Transgenic Maize. Methods in Molecular Biology*. Totowa, (NJ): Humana Press. pp. 47–58.
41. Stewart, N., Via L. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR application. *BioTechnique*, 14 (5), pp. 748–749.
42. Lakhneko, O., Stepanenko, A., Kuzminskiy, Y., Borisjuk, N., and Morgun, B. (2021). Survey of Drought-Associated TAWRKY2-D1 Gene Diversity in Bread Wheat and Wheat Relatives. *Molecular biotechnology*, 63(10), pp. 953–962.
43. Степаненко А., Лахнеко О., Маринченко Л., Банникова М. (2021). *Основи молекулярної біології-2. Молекулярна біологія РНК та синтезу білків: Лабораторний практикум*. Київ: КПП ім. Ігоря Сікорського.
44. Bairu, M., Aremu, A. and Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, pp. 147–173.

ДОДАТКИ

Додаток А

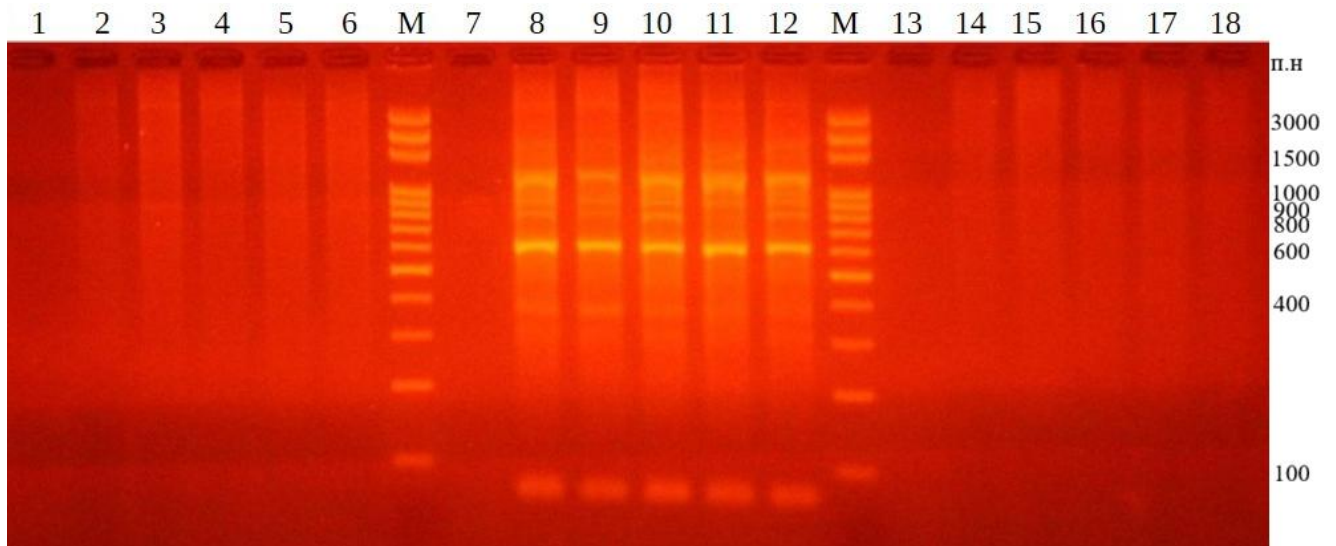


Рис. А.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання комбінації праймерів Sa/Wh (1 – негативний контроль; 2 – селекційна лінія *T. spelta* 4; 3 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 4 – сорт Filderweiss; 5 – сорт Zuricher Rotkorn; 6 – сорт Зоря України); праймера Sa/Su (7 – негативний контроль; 8 – лінія *T. spelta* 4; 9 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 10 – сорт Filderweiss; 11 – сорт Zuricher Rotkorn; 12 – сорт Зоря України); праймера Su/Ni (13 – негативний контроль; 14 – лінія *T. spelta* 4; 15 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 16 – сорт Filderweiss; 17 – сорт Zuricher Rotkorn; 18 – сорт Зоря України); М – маркер молекулярних мас

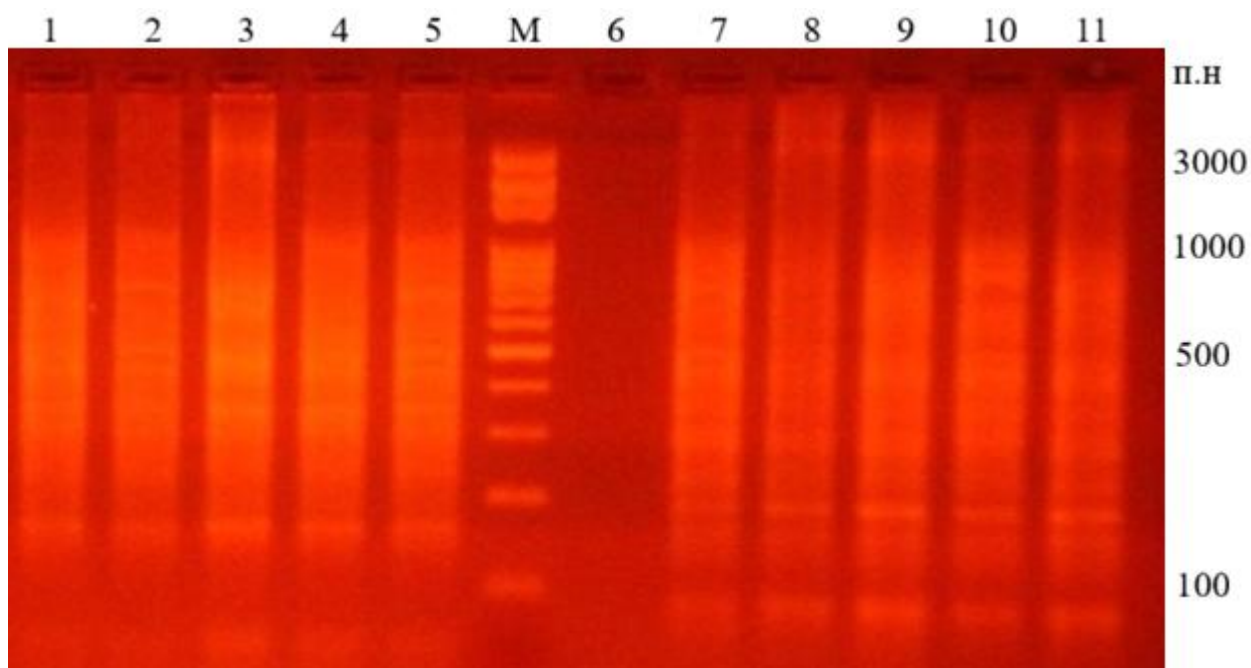


Рис. А.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК спельти за використання комбінації праймерів Su/St (1 – селекційна лінія *T. spelta* 4; 2 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 3 – сорт Filderweiss; 4 – сорт Zuricher Rotkorn; 5 – сорт Зоря України); праймера Su/Wh (6 – негативний контроль; 7 – лінія *T. spelta* 4; 8 – сорт Oberkulmer Rothkorn; 9 – сорт Filderweiss; 10 – сорт Zuricher Rotkorn; 11 – сорт Зоря України); М – маркер молекулярних мас

Додаток Б**Таблиця Б.1**

Кількість та приблизний розмір ампліконів у мономорфних спектрах продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків вихідних генотипів за використання різних праймерів та їх комбінацій

Праймери	Кількість ампліконів, шт	Приблизний розмір ампліконів, п.н.
Da	5	385, 450, 620, 800, 4120
Su	1	430
Wis	1	3960
Wh	2	740, 920
Sa/ Wi	6	260, 300, 430, 520, 750, 3690
Su/St	2	180, 3500
Su/Wh	2	190, 3500

Таблиця Б.2

Кількість та приблизний розмір ампліконів у поліморфних спектрах продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків вихідних генотипів за використання праймерів

Праймер	Генотип	Кількість ампліконів, шт	Приблизний розмір ампліконів, п.н.
Sa	S4	3	1450, 2020, 3430
Sa	OR	3	1510, 2165, 3530
Sa	Fw	3	1490, 2135, 3430
Sa	ZR	5	1240, 1555, 1935, 2290, 3590
Sa	3Y	3	1555, 2075, 2260
Wi	S4	2	310, 555

Продовження таблиці Б.2

Wi	OR	2	310, 590
Wi	Fw	2	560, 635
Wi	ZR	5	310, 370, 410, 480, 650
Wi	3Y	5	310, 340, 380, 470, 635
Ni	S4	7	260, 310, 470, 575, 807, 1100, 2165
Ni	OR	3	1360, 1720, 2710
Ni	Fw	7	260, 315, 890, 1060, 1280, 1678, 2500
Ni	ZR	4	900, 1310, 1700, 2670
Ni	3Y	4	1100, 1410, 1810, 2780
St	S4	3	430, 621, 1030
St	OR	3	615, 785, 1140
St	Fw	2	615, 1050
St	ZR	3	590, 767, 1150
St	3Y	3	415, 600, 1095

Таблиця Б.3

Кількість та приблизний розмір ампліконів у поліморфних спектрах продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків вихідних генотипів за використання комбінації праймерів

Праймер	Генотип	Кількість ампліконів, шт	Приблизний розмір ампліконів, п.н.
Da/Su	S4	3	105, 190, 330,
Da/Su	OR	4	330, 100, 180, 3350
Da/Su	Fw	4	100, 180, 190, 260
Da/Su	ZR	2	105, 260
Da/Su	3Y	6	145, 261, 330, 500, 550, 640
Da/Sa	S4	4	140, 190, 295, 650
Da/Sa	OR	6	140, 240, 300, 410, 650, 1010
Da/Sa	Fw	2	150, 305
Da/Sa	ZR	3	290, 480, 790
Da/Sa	3Y	4	160, 310, 640, 950
Sa/St	S4	4	560, 650, 830, 1320
Sa/St	OR	3	700, 870, 1470
Sa/St	Fw	4	570, 685, 840, 1350
Sa/St	ZR	5	580, 700, 855, 1410, 2700
Sa/St	3Y	5	580, 690, 880, 1350, 2560
Sa/Ni	S4	5	280, 450, 800, 1350, 2700
Sa/Ni	OR, Fw	4	280, 810, 1400, 2820
Sa/Ni	ZR	3	840, 1050, 1470

Продовження таблиці Б.3

Sa/Ni	3У	5	280, 450, 800, 1375, 2750
Sa/Su	S4 – Fw	6	360, 600, 800, 910, 1180
Sa/Su	ZR	4	600, 910, 1120
Sa/Su	3У	5	600, 800, 910, 1180