

УДК 575.113.2:633.16:663.421

С. С. ПОЛІЩУК, мол. наук. співроб.,  
СГІ–НЦНС, Одеса,  
Б. В. МОРГУН, к. б. н., зав. від.,  
Ін-т клітинної біології і генетичної інженерії НАН України,  
О. І. РИБАЛКА, д. б. н., зав. від., СГІ–НЦНС, Одеса  
e-mail: alex.rybalka@mail.ru

## ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ *Bmy1*, *LOX-1* та *Wax* ЯК ДЕТЕРМІНАНТІВ ОЗНАК ХАРЧОВОЇ ЦІННОСТІ ЗЕРНА ЯЧМЕНЮ

Досліджено алельний стан генів *Bmy1*, *LOX-1* та *Wax*, що контролюють активність кількох ключових ферментів та визначають важливі характеристики харчової цінності зерна ячменю. Серед дослідженого колекційного матеріалу вітчизняних сортів ячменю не знайдено жодного алельного варіанта цих генів, які сьогодні активно використовуються у світовій селекції сортів ячменю, спеціалізованих за напрямами харчового використання зерна.

**Ключові слова:** молекулярно-генетичний аналіз, ячмінь, гени,  $\beta$ -амілаза, ліпоксигеназа, ваксі, харчова цінність зерна.

**Вступ.** До харчових продуктів, що виготовляються із зерна ячменю, належить цілий ряд найменувань, таких як крупи, пластівці, чимало сортів хліба, різні зброженні напої, пиво, віскі тощо. Харчова якість цих продуктів детермінується комплексом генів, що експресуються в зерні ячменю та контролюють реакції синтезу або розпаду компонентів зерна у процесі його технологічної переробки. З-поміж численних генів, що відіграють важливу роль у визначенні харчової якості продуктів переробки зерна, у роботі акцентується увага на трьох із них: *Bmy1*, *LOX* та *Wax*.

***Bmy1*** – один з найважливіших генів, який контролює біосинтез критично важливого для етапу осолоджування і зброжування ячмінного сусла ферменту  $\beta$ -амілази при виготовленні пива, віскі та інших подібних напоїв із зерна ячменю. Гідролітична активність та термостабільність  $\beta$ -амілази визначається алельним станом III інтрону гена *B*, у довгому плечі четвертої хромосоми ячменю. III інtron гена *Bmy1* є поліморфним — знайдено три алелі: *Bmy1.a*, *Bmy1.b* та *Bmy1.c*, кожен з яких експресується у фермент з різним рівнем активності та термостабільності  $\beta$ -амілази у солоді [1].

Так, значення активності  $\beta$ -амілази у зерні сортів ячменю з алелем *Bmy1.b* буловищим відповідного показника у сортів з алелем *Bmy1.a* у 1,3 раза; значення активності ферменту в зерні єдиного сорту алелю *Bmy1.c* виявилось у 2,1 раза вищим за цей показник у сортів з алелем

*Bmy1.a* [2]. Залишкова активність  $\beta$ -амілази як показник термостабільності ферменту у сортів ячменю з алелями *Bmy1.a*, *Bmy1.b* та *Bmy1.c* була на рівні 3,6, 26,4 та 58,7 % відповідно [3].

**LOX-1** — кодує біосинтез ферменту зерна ячменю ліпоксигенази, локалізований у четвертій хромосомі, і каталізує утворення 9-гідроперекису, що призводить до виникнення сполук, які псуєть смакові властивості зброжених напоїв, особливо пива: транс-2-ноненаль та тригідроксиоктодецилова кислота. Транс-2-ноненаль вважається основною причиною так званого «картонного смаку» пива, що знаходилось тривалий час у контакті з повітрям. Інший продукт окислення — 3-гідроксиоктодецилова кислота — негативно впливає на якість пива у термінах стабільності піни та смакових характеристик напою [4].

**Wax** — ген, що кодує біосинтез ключового ферменту біосинтезу амілози крохмалю зерна ячменю. Має назву *Wx*-протеїн, або асоційована з гранулами крохмалю синтаза крохмалю GBSS I (*Granule Bound Starch Synthase I*, GenBank accession number: P09842) з молекулярною масою близько 60 кДа. У ячменю активність ферменту GBSS I та відповідно прояв ознаки ваксі контролює ген *Wax*, що локалізований на короткому плечі хромосоми 7Н. Рецесивний алель цього гена практично повністю блокує біосинтез амілози крохмалю, і її кількісний вміст у крохмалі змінюється від норми 20–25 до 0–5 %. Серед світового сортименту ячменю виявлено 2 функціональні алелі гена *Wax* та один нуль-алель або алель **wax** [6].

Зерно ячменю з алелем *wax* у порівнянні зі звичайним ячменем містить на 32–41 % більше некрохмалистих полісахаридів  $\beta$ -глюканів. Крім того, зерно ячменю *wax* має у середньому на 25 % вищий вміст ліпідів, ніж зерно звичайного ячменю. У деяких мутантних формах голозерного ячменю, створених нещодавно в Канаді, знайдено до 15–16 %  $\beta$ -глюканів.  $\beta$ -глюкани є фактором підвищеної харчової цінності зерна ячменю, сприяють зниженню шкідливого холестерину у плазмі крові людини, знижують гліцемічний індекс продуктів із зерна ячменю і мають загалом високу дієтичну цінність [7].

Результати дослідження алельного стану вищезгаданих генів серед колекції сортів і селекційних ліній ячменю різного походження викладені у цій статті.

**Матеріал і методи.** Дослідження виконувалися з використанням 126 сортів і ліній ячменю вітчизняної та зарубіжної селекції, селекційних ліній ячменю з колекції відділу генетичних основ селекції СГІ. Лабораторні тести виконувалися на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м. Київ).

Молекулярно-генетичний аналіз алельного поліморфізму генів *Bmy1* та *LOX-1* виконували з використанням загальної ДНК, виділеної з проростків за загальноприйнятою методикою, застосовуючи ЦТАБ-буфер [4]. Детекцію алелів генів *Bmy1* та *LOX-1* здійснювали за допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів (табл. 1).

Таблиця 1

Послідовності алель-специфічних праймерів, застосовані у роботі

Назва	Послідовність праймера, 5' → 3'	Очікуваний фрагмент, п. н.	Цільовий ген	Цитоване джерело
b-amylF	GATGGTCGTTCCCAGGCATC	477 ( <i>Bmy1.c</i> ), 516 ( <i>Bmy1.b</i> ), 643 ( <i>Bmy1.a</i> )	III інtron гена <i>Bmy1</i>	Kihara et al., 1998 [8]
b-amylR	AGGGAACCGCACGTGGGG GTCATGA			
LOX-1 F	CCATCACGCAGGGCATCCTG	після рестрикції ендонуклеазою <i>RsaI</i> : 700+300+ + 220 ( <i>LoxA</i> ); 700 + 520 ( <i>loxA</i> )	<i>LOX-1</i>	Hirota et al., 2005 [4]
LOX-1 R	GCGTTGATGAGCGTCTGCCG			

ПЛР на ген *LOX-1* проводилася за принципом низхідної ПЛР (Touchdown PCR) за наступних умов: денатурація — 4 хв при 94 °C; далі 5 циклів (30 с — 94 °C; 30 с — 70 °C; 41 с — 72 °C); 30 циклів (30 с — 94 °C; 30 с — 65 °C; 41 с — 72 °C); 5 хв при 72 °C; 2 хв — 22 °C.

ПЛР проводилася в термоциклері (Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler). При визначенні алелів гена *Bmy1* та *LOX-1* у склад реакційної суміші, що містила 20 мкл, входили: 30 мкмоль ДНК, 0,75 од. Тақ полімерази (DreamTaq Polymerase — Thermo Scientific), 0,5 мкмоль кожного праймера.

Умови ПЛР для детекції гена *Bmy1*: денатурація — 4 хв при 94 °C; далі 34 цикли (30 с — 94 °C; 30 с — 57 °C; 41 с — 72 °C); 5 хв при 72 °C; 2 хв — 22 °C.

Рестрикційний аналіз алельного стану гена *LOX-1* проводили у загальному об'ємі 30 мкл, який містив 10 мкл продуктів ПЛР, 2 мкл 10x буферу Tango (Thermo Scientific), 4 од. активності ендонуклеази *RsaI*. Реакцію інкубували при температурі 37±1 °C протягом 1,5 години. Продукти рестрикції розділяли в 1,2 % агарозному гелі, документували цифровим фотоапаратом Canon EOS 600D та обробляли зображення програмами GIMP та MS Office PowerPoint.

Виділення загальної ДНК для аналізу *Wax* алелів виконували ЦТАБ методом з модифікаціями із замороженої зеленої маси та зерна. Якість та концентрацію виділеної загальної ДНК визначали спектрофотометрично на приладі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Полімеразна ланцюгова реакція з використанням низхідної процедури (Touchdown) на ген *Wax* ячменю проводилася з праймерами, запропонованими [6] на ампліфікаторі Thermo Scientific Arctic. Кожна реакція містила 30 нг загальної рослинної ДНК, а для ампліфікації використовувалася 0,5 од. DreamTaq™ полімерази (Thermo Scientific).

Умови реакції: початкова денатурація при 94 °C — 3 хв; 8 циклів — денатурація при 94 °C — 30 с; при температурі, вищій за температуру відпала праймерів — 62 °C — 30 с і з кожним циклом температура зменшується на 1 °C і елонгація при 72 °C — 1 хв 10 с та ще 28 циклів — денатурація при

94 °C — 30 с; при температурі відпалу праймерів — 54 °C — 30 с; елонгація при 72 °C — 1 хв 10 с та 5 хв фінальна елонгація. Продукти ампліфікації візуалізували в ультрафіолетовому світлі після їх електрофоретичного розділення у 1,2 %-му агарозному гелі натрій боратному буфері з 0,5 мг/мл бромистого етидію. При наявності функціональних алелів дикого типу очікуються амплікони розміром 802 п. н. чи 1010 п. н. Амплікон розміром 592 п. н. вказує на присутність нуль-алеля за даним геном і відповідно модифікований склад крохмалю. У випадку гетерогенності досліджуваного зразка спостерігали наявність ампліконів кількох типів.

**Результати і їх обговорення.** Для виконання молекулярно-генетичного аналізу сортів ячменю з метою ідентифікації алельного стану генів *Bmy1* (рис. 1) та *LOX-1* (рис. 2) були підібрані параметри проведення ПЛР із застосуванням градієнта температур відпалу праймерів та використанням раніше опублікованої інформації з джерел літератури.

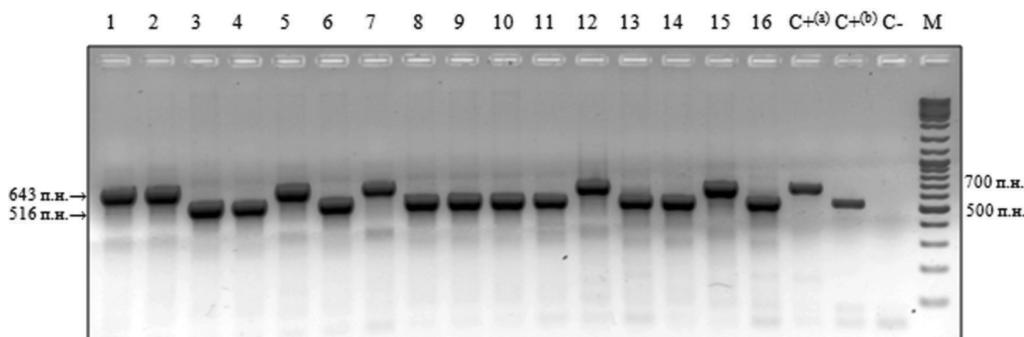


Рис. 1. Електрофореграма тесту на виявлення алелів *Bmy1.a* (643 п. н.) та *Bmy1.b* (516 п. н.) гена *Bmy1*. Доріжка 1 — сорт Henley, 2 — Ilot, 3 — Daura, 4 — Kangoo, 5 — Bellona, 6 — Malz, 7 — Kristalia, 8 — Marthe, 9 — Козван, 10 — Bojos, 11 — Annabell, 12 — Henrike, 13 — Jennifer, 14 — Quench, 15 — KWS Aliciana, 16 — Святогор. Позитивні контролі: C<sup>(a)</sup> — алель *Bmy1.a* сорту Ітіль, C<sup>(b)</sup> — алель *Bmy1.b* сорту Зоряний. М — маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix. С — негативний контроль, буфер TE

На електрофореграмі (рис. 1) спостерігали розподіл досліджуваних зразків ячменю на дві групи залежно від алельного стану гена *Bmy1*: для сортів з алелем *Bmy1.a* характерна поява амплікону розміром 643 п. н., в той час як сортам з алелем *Bmy1.b* властивий амплікон довжиною 516 п. н. Порівнюючи результати електрофорезу 16 зразків із маркером молекулярних мас (зразок «М», рис. 1) та із позитивним контролем (зразки C<sup>(a)</sup> та C<sup>(b)</sup>, рис. 1), було встановлено алельний стан гена *Bmy1* для 16 зразків, що представлений в описі до електрофореграми. У представленому досліді виявилось, що 6 сортів ячменю (Henley, Ilot, Bellona, Kristalia, Henrike та KWS Aliciana) містять алель *Bmy1.a* гена *Bmy1*. У геномі інших 10 сортів (Daura, Kangoo, Malz, Marthe, Козван, Bojos, Annabell, Jennifer, Quench та Святогор) ген *Bmy1* був представлений алелем *Bmy1.b*. Отже,

можна стверджувати, що 10 сортів із алелем *Bmy1.b* мають перспективу використання для виготовлення зброжених напоїв із зерна ячменю та у пивоварінні.

Описаним шляхом був проведений аналіз усієї колекції ячменю.

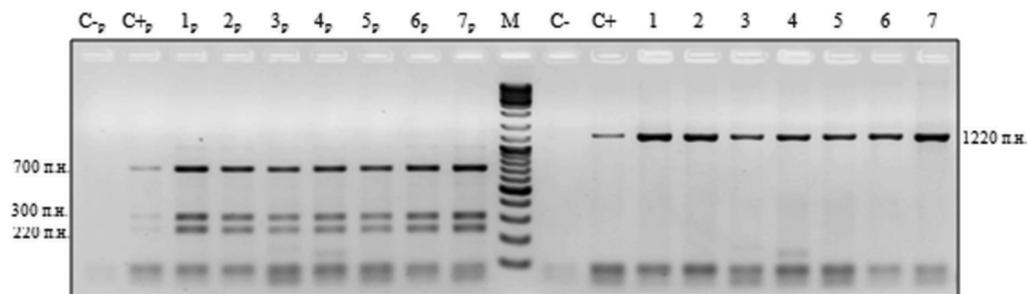


Рис. 2. Електрофореграма аналізу виявлення алелів *Lox A* (700+300+220 п. н.) та *lox A* (700+520 п. н.) гена *LOX-1* з використанням ендонуклеази *RsaI* (зразки з індексом «р» — після обробки рестриктацією) у сортів: доріжка 1 — KWS Aliciana, 2 — Quench, 3 — Jennifer, 4 — Henrike, 5 — Annabell, 6 — Bojos, 7 — Козван. Позитивний контроль (C+) — алель *Lox A* сорту CDC Kendall [9]. М — маркер молекулярних мас GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix. С- — негативний контроль, буфер TE

Приклад аналізу алельного стану гена *LOX-1* сортів ячменю представлено на рисунку 2. На електрофореграмі показано продукти ампліфікації ПЛР на праймери *Lox-1 F* та *Lox-1 R* (зразки № 1–7 та C+, рис. 2), а також результати подальшої рестрикції ендонуклеазою *RsaI* (зразки № 1p-7p та C+, рис. 2). Аналіз показав, що всі досліджувані сорти (KWS Aliciana, Quench, Jennifer, Henrike, Annabell, Bojos, Козван) мали домінантний алель *Lox-A*. Отже, на жаль, пивоварна якість зазначених зразків ячменю не може бути задовільною у зв'язку з наявністю у них активного алеля для ліпоксигенази-1. Подібним чином було виконано дослідження з визначення алельного стану гена *LOX-1* для всіх інших сортів колекції.

У таблиці 2 наведено результати аналізу алельного поліморфізму гена *Bmy1* серед колекції сортів ячменю. Подано назву сорту, його походження, алельний стан гена *Bmy1*, очікувана термостабільність та якість зерна сорту за Державним реєстром сортів рослин, придатних для поширення в Україні в 2013 році [9].

За результатами аналізу було визначено алельний стан гена *Bmy1* для 103 зразків ДНК, виділених із колекції вітчизняних та зарубіжних сортів ячменю і селекційних ліній. У досліджуваній колекції представлено 32 зарубіжні сорти ячменю (31 % колекції) та 71 вітчизняних сортів і ліній (69 % колекції).

За даними дослідів виявилося, що 63 сорти ячменю (61 % загальної кількості) мали алель *Bmy1.b*, 33 (32 % колекції) мали алель *Bmy1.a*, а сім сортів (7 % загальної кількості рослин) були гетерогенними за алельним станом гена *Bmy1*. Сортів ячменю з найактивнішим алелем *Bmy1.c* у колекції, на жаль, не виявлено.

Таблиця 2

Розподіл сортів та селекційних ліній ячменю за алелями гена *Bmy1*

Сорт, селекційна лінія	Країна походження	Фрагмент 126 п. н.	Фрагмент 39 п. н.	Алель	Термо-стабільність	Якість
Annabell	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Barke	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Beatrix	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Bellona	Німеччина	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
Bojos	Чехія	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
CDC Alamo	Канада	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	кормовий
CDC Candle	Канада	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	кормовий
CDC Gainer	Канада	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	н/в*
<i>CDC McGwire</i>	Канада	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Claire	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Kristalia	ВБ**	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Danuta	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Datcha	Франція	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Daura	н/в	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
Ebson	Чехія	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Gladys	Нідерланди	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Golden Promise	США	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
Golden Promise (л. тр. *** 2 x5)	США	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
Golden Promise (л. тр. 3 y10)	США	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
Golden Promise (л. тр. 4 x5+y10)	США	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
Henley	Австралія	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	н/в
Henrike	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
<i>Hordeum vulgare var. trifurcatum</i>	Монголія	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
JB Maltasia	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Jennifer	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Jersey	Нідерланди	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Kangoo	Нідерланди	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
KWS Aliciana	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
KWS Bambina	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Ksanadu	Німеччина	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
Malz	Чехія	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Marthe	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	фуражний
Philadelphia	США	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Quench	ВБ**	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Rosalina	Данія	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Scarlett	Чехія	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Shakira	Німеччина	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Адапт	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	фуражний

Продовження табл. 2

Сорт, селекційна лінія	Країна походження	Фрагмент 126 п. н.	Фрагмент 39 п. н.	Алель	Термостабільність	Якість
Ахіллес	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	кормовий
Вакула	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Вестнік	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	кормовий
Водограй	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Воєвода	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
Всесвіт	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Галактик	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Галатея	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	кормовий
Галичанин	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Гамбрінус	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Геліос	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Гетьман	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
Дерибас	Україна	+	+	гетеро	низька	пивоварний
Дружба	Україна	+	+	гетеро	низька	пивоварний
Едем	Україна	+	+	гетеро	низька	пивоварний
Еней	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Зоряній	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Ілот	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	фуражний
Ітіль	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	кормовий
Казковий	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Козван	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Козацький	Україна	+	+	гетеро	низька	фуражний
Командор	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
Лука	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	фуражний
Медікум 46	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
Модерн	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Незалежний	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
Нутанс 106	Україна	+	+	гетеро	низька	пивоварний
Нутанс 244	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Нутанс 518	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
Нутанс 778	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
Оболонь	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Одеський 9	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Одеський 14	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	н/в
Одеський 18	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	н/в
Одеський 36	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	кормовий
Одеський 69	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	кормовий
Одеський 70	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	кормовий
Одеський 100	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Одеський 111	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Одеський 115	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Одеський 131	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	фуражний
Одеський 151	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Одеський 518	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	н/в

Закінчення табл. 2

Сорт, селекційна лінія	Країна походження	Фрагмент 126 п. н.	Фрагмент 39 п. н.	Алель	Термо-стабільність	Якість
Паллідум 32	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Паллідум 103	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Первенець	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	кормовий
Переможний	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	н/в
Південний	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Прерія	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Престиж	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	кормовий
Романтик	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Рось	Україна	+	+	гетеро	низька	пивоварний
Святогор	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	пивоварний
Селеніт	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Славутич	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Сталкер	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	фуражний
Степовий	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Тайфун	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	фуражний
Хадар	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	низька	фуражний
Чарівний	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Чорноморець	Україна	+	+	гетеро	низька	кормовий
Чудовий	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний
Южний	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	кормовий
Юкатан	Україна	-	+	<i>Bmy1.b</i>	середня	пивоварний

Примітки: \*н/в — немає відомостей; \*\*ВБ — Великобританія; «гетеро» — гетерогенний, тобто присутні обидва алелі, що вказує на генетичну строкатість сорту; \*\*\*л. тр. — лінія трансформована.

Якщо брати до уваги розподіл зразків ячменю за територіальною ознакою, то виявиться, що із досліджуваних 71 вітчизняних зразків колекції ячменю 37 сортів (52 % колекції) мають алель *Bmy1.b*, 27 (38 %) — алель *Bmy1.a*, 7 сортів (10 %) мають обидва алелі. Серед зарубіжних сортів, кількість яких складає 32 зразки, 26 (81 %), мали алельний стан *Bmy1.b* і лише 6 сортів (18 %) — алель *Bmy1.a*. Такий розподіл алелів свідчить про багатше різноманіття алелів гена *Bmy1*, яке притаманне ячменям зарубіжної селекції. Це означає, що подальший пошук перспективних для процесу ферментації алелів гена *Bmy1* доцільно проводити серед сортів закордонної селекції залученням мутаційної селекції та дикорослих донорів.

Дослідження алельного стану гена *LOX-1* показало його повний мономорфізм серед вивчені колекції 103 зразків ячменю. Зразків з алелем *loxA* не виявлено. Всі досліджені зразки ячменю мають активну ліпоксигеназу-1, пов'язану з зіпсованим смаком пива.

Аналіз рослинного матеріалу для визначення алельного стану гена *Wax* проводили за допомогою специфічного молекулярного маркера.

Дана система детекції алельного стану гена дозволяє визначати як гомозиготні (гомогенні), так і гетерозиготні (гетерогенні) зразки, тобто є кодомінантною. Результати типових ампліфікацій наведені на рисунках 3 та 4.

Зразки 1–11, 13–15 містять амплікони розміром 802 п. н., 1010 п. н. чи й обидва, що свідчить про наявність алеля дикого типу.

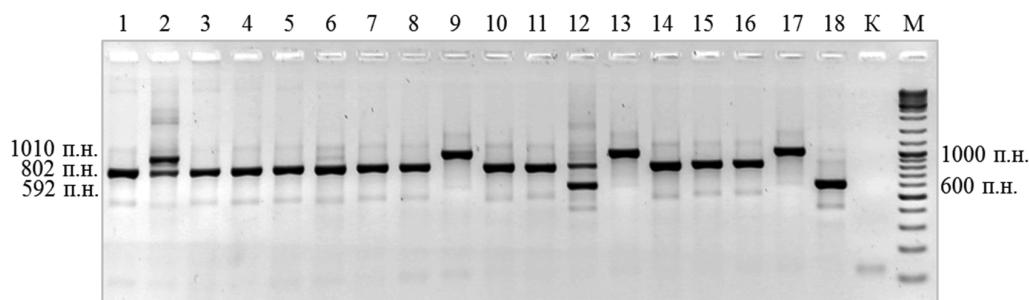


Рис. 3. Електрофореграма продуктів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wax* ячменю. Розмір фрагментів маркера вказано праворуч. Доріжка 1 — сорт Одеський 36; 2 — Чорноморець; 3 — Нутанс 106; 4 — Славутич; 5 — Одеський 69; 6 — Одеський 70; 7 — KWS Bambina; 8 — Beatrise; 9 — Datcha; 10 — Golden Promise; 11 — Ksanadu; 12 — Alamo; 13 — Еней; 14 — лінія Golden Promise Tr2 (x5); 15 — Хадар; 16 — контрольний сорт Rosalina, який несе алель 802 п. н.; 17 — контрольний сорт Danuta, який несе алель 1010 п. н.; 18 — контрольний сорт Candle, який несе нуль-алель 592 п. н.; К — негативний контроль, ТЕ буфер; М — маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Зразок 12 є гетерогенний, оскільки містить як алель дикого типу, так і нуль-алель. Для контролю наявності алелів дикого типу використовували сорти Rosalina, який несе алель 802 п.н (доріжка 16), та Danuta, який несе алель 1010 п. н. (доріжка 17), і нуль-алель — сорт Candle (доріжка 18), характеристики яких відомі з літератури. В якості негативного контролю ПЛР реакції використовували реакційну суміш, до якої замість загальної ДНК додавали розчинник, ТЕ буфер.

Зразки ячменю (рис. 4) 1–5, 7–15 містять амплікони розміром 802 п. н. або 1010 п. н., що свідчить про наявність алелів дикого типу. Зразок 6 (канадський комерційний сорт ячменю ваксі Alamo) має амплікон розміром 592 п. н., що свідчить про наявність нуль-алеля гена *Wax*. Цей сорт використовується нами у схрещуваннях як донор рецесивного алеля гена *Wax* і відповідно ознаки ваксі. Результати дослідження алельного стану гена *Wax* зразків колекції наведено в таблиці 3.

У рамках дослідження було опрацьовано 126 зразків ячменю і виявлено всі три алельні варіанти гена *Wax*. Було виявлено 8 гетерогенних зразків, з яких 7 містять амплікони двох типів 802 та 1010 п. н., та зразок сорту Alamo, який несе нуль-алель (амплікон 592 п. н.) разом із функціональним алелем (амплікон 802 п. н.).

Загалом серед гомогенних зразків виявлено 91 такий, що має функціональний алель, який вирізняється розміром амплікону в 802 п. н.;

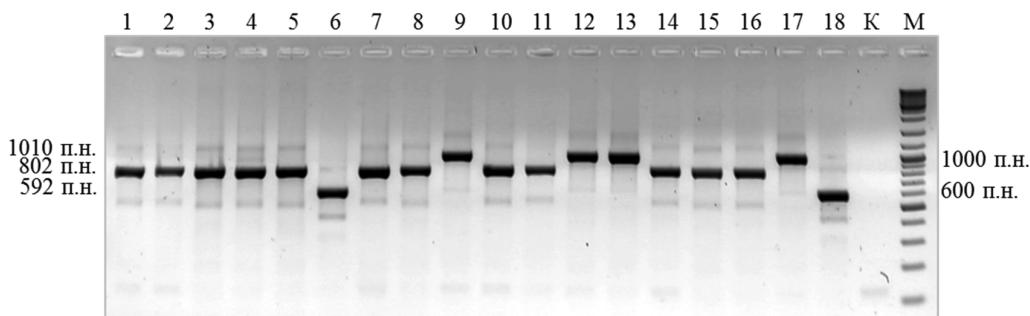


Рис. 4. Електрофореграма продуктів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wax* ячменю. Розмір фрагментів маркера вказано праворуч. Доріжка 1 — сорт Claire; 2 — Модерн; 3 — Gainer; 4 — Козацький; 5 — лінія Golden Promise Tp4 (x5+y10); 6 — сорт Alamo; 7 — Ахіллес; 8 — лінія Golden Promise Tp3 (y10); 9 — сорт Annabell; 10 — Лука; 11 — JB Maltasia; 12 — Галичанин; 13 — Командор; 14 — Shakira; 15 — Ахіллес; 16 — контрольний сорт Rosalina; 17 — контрольний сорт Danuta; 18 — контрольний сорт Candle; K — негативний контроль; M — маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Таблиця 3

Результати дослідження алельного стану гена *Wax* у зразків ячменю

№	Зразок	<i>Wax/wax</i>	№	Зразок	<i>Wax/wax</i>
1	Abyssinian 1105	1010 п. н.	22	JB Maltasia	802 п. н.
2	Alamo	592/802 п. н.	23	Jennifer	802 п. н.
3	Alamo	592 п. н.	24	Jennifer (Київ)	802 п. н.
4	Albert	1010 п. н.	25	Jet	1010 п. н.
5	Annabell	1010 п. н.	26	Kangoo	802 п. н.
6	Arabische	1010 п. н.	27	KWS Aliciana	802 п. н.
7	Azimuth	802 п. н.	28	Kristalia	802 п. н.
8	Beatrise	802 п. н.	29	Ksanadu	802 п. н.
9	Bellona	802/1010 п. н.	30	Mal 7	802 п. н.
10	Bojos	802 п. н.	31	Marthe	802 п. н.
11	Candle	592 п. н.	32	McGwire	802 п. н.
12	Danuta	1010 п. н.	33	McGwire	802 п. н.
13	Daura	802 п. н.	34	Negro Manfredi	802 п. н.
14	Fibon	802 п. н.	35	Olande	802 п. н.
15	Gainer	802 п. н.	36	Philadelphia	802 п. н.
16	Golden Promise	802 п. н.	37	Shakira	802 п. н.
17	Golden Promise Tp2 x5	802 п. н.	38	Sulto	802 п. н.
18	Golden Promise Tp3 y10	802 п. н.	39	Адапт	1010 п. н.
19	Golden Promise Tp4 x5+y10y	802 п. н.	40	Ахіллес	802 п. н.
20	Henley	802 п. н.	41	Ахіллес	802 п. н.
21	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>trifurcatum</i>	1010 п. н.	42	Барка	802 п. н.

## Закінчення табл. 3

№	Зразок	Wax/wax
43	Беатрикс	802 п. н.
44	Вакула	802 п. н.
45	Вестнік	802 п. н.
46	Водограй	1010 п. н.
47	Воєвода	802 п. н.
48	Воєвода	802/1010 п. н.
49	Всесвіт	802/1010 п. н.
50	Галактик	802/1010 п. н.
51	Галатея	802 п. н.
52	Галичанин	1010 п. н.
53	Гамбрінус	802 п. н.
54	Геліос	802 п. н.
55	Геліос	802 п. н.
56	Геліос 1	802 п. н.
57	Геліос	802 п. н.
58	Гетьман	802 п. н.
59	Gladys	802 п. н.
60	Datcha	1010 п. н.
61	Дерибас	802 п. н.
62	Jersey	802 п. н.
63	Дружба	802 п. н.
64	Ebson	802 п. н.
65	Едем	802 п. н.
66	Еней	1010 п. н.
67	Henrike	802 п. н.
68	Зоряний	802 п. н.
69	Iлот	802 п. н.
70	Iтиль	1010 п. н.
71	Казковий	802 п. н.
72	Quench	802 п. н.
73	KWS Bambina	802 п. н.
74	Claire	802 п. н.
75	Козван	802 п. н.
76	Козацький	802 п. н.
77	Командор	1010 п. н.
78	Командор	1010 п. н.
79	Лука	802 п. н.
80	Лука	802 п. н.
81	Медікум 46	802 п. н.
82	Модерн	802 п. н.
83	Модерн	802 п. н.
84	Незалежний	802 п. н.

№	Зразок	Wax/wax
85	Нутанс 244	802 п. н.
86	Нутанс 778	1010 п. н.
87	Нутанс 106	802 п. н.
88	Нутанс 518	802 п. н.
89	Оболонь	802 п. н.
90	Одеський 100	802/1010 п. н.
91	Одеський 111	802 п. н.
92	Одеський 115	802 п. н.
93	Одеський 131	1010 п. н.
94	Одеський 14	802 п. н.
95	Одеський 151	1010 п. н.
96	Одеський 18	802 п. н.
97	Одеський 36	802 п. н.
98	Одеський 69	802 п. н.
99	Одеський 70	802 п. н.
100	Одеський 82	802 п. н.
101	Одеський 9	1010 п. н.
102	Паллідум 107	1010 п. н.
103	Паллідум 32	1010 п. н.
104	Первенець	802 п. н.
105	Переможний	802 п. н.
106	Південний	1010 п. н.
107	Прерія	1010 п. н.
108	Престиж	802 п. н.
109	Rosalina	802 п. н.
110	Романтик	802 п. н.
111	Рось	802 п. н.
112	Святогор	802 п. н.
113	Святогор	802 п. н.
114	Селеніт	802 п. н.
115	Скарлет	802 п. н.
116	Славутич	802 п. н.
117	Сталкер	802 п. н.
118	Степовий	802 п. н.
119	Тайфун	1010 п. н.
120	Хадар	802 п. н.
121	Чарівний	802 п. н.
122	Чорноморець	802/1010 п. н.
123	Чудовий	1010 п. н.
124	Charmay	802 п. н.
125	Южний	802/1010 п. н.
126	Юкатан	802 п. н.

25 зразків з розміром амплікону 1010 п. н. та 2 зразки ваксі ячменю — Candle та Alamo, які несуть нуль-алель (амплікон 592 п. н.). Частота виявлення у досліджуваній вибірці гомогенних зразків складає 93,6 %, гетерогенних — 6,4 %.

Отримані у цьому дослідженні дані стосовно алельного стану генів *Bmy1*, *LOX-1* та *Wax*, як і вивчені колекційні зразки ячменю, широко використовуються у відділі генетичних основ селекції СГІ у програмі створення селекційного матеріалу для сортів ярого і озимого голозерного ячменю харчового і кормового напрямів технологічного використання зерна.

**Висновки.** 1. У результаті дослідження колекції сортів ячменю було виявлено 63 зразки з потенційно середньою активністю та термостабільністю ферменту  $\beta$ -амілази, критичного для процесу ферmentації зерна ячменю, що кодується алелем *Bmy1.b* гена *Bmy1*. Жодного зразка ячменю з алелем *Bmy1.c*, що контролює максимальну активність і термостабільність  $\beta$ -амілази, не виявлено.

2. Аналіз генетичних варіантів ферменту ліпоксигенази-1, що кодується геном *LOX-1*, показав мономорфізм колекції сортів ячменю за алельним станом цього гена і відсутність неактивного алеля *lox A*.

3. ПЛР тест дозволяє надійно ідентифікувати як гомогенні, так і гетерогенні за алельним станом досліджених локусів зразки ячменю.

4. Серед вітчизняних сортів ячменю спостерігається відсутність *wax* (нуль-алелю). Це свідчить про те, що в Україні до цього часу не велася селекція сортів ячменю ваксі. В той же час селекція ячменів ваксі активно розвивається за кордоном, особливо у напрямі створення сортів ячменю харчового та кормового напрямів використання зерна.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Vinje M. A., Duke S. H., Henson C. A. Utilization of different *Bmy1* intron III alleles for predicting  $\beta$ -amylase activity and thermo stability in wild and cultivated barley. Plant Molecular Biological Report. — 2010. — Vol. 28, Issue 3. — P. 491–501.
2. Erkkilä J. M. Intron III-specific for screening of  $\beta$ -amylase alleles in barley cultivars. Plant Molecular Biology Reporter. — 1999. — Vol. 17. — P.139–147.
3. Zhang W., Kaneko T., Takeda K.  $\beta$ -Amylase variation in wild barley accessions. Breeding Science. — 2004. — Vol. 54. — P. 41–49.
4. Hirota N., Kaneko T., Kuroda H., Kaneda H., Takashio M., Ito K., Takeda K. Characterization of lipoxygenase-1 null mutants in barley // Theoretical & Applied Genetics. — 2005. — Vol. 111, Issue 8. — P. 1580–1584.
5. Ishikawa N. Artificial induction and characterization of amylose-free mutants of barley // Barley Genet. News. — 1995. — Vol. 24. — P. 49–53.
6. Domon E. The insertion / deletion polymorphisms in the waxy gene of barley genetic resources from East Asia // TheorAppl Genet. — 2002. — Vol. 104. — P. 132–138.
7. Кирдогло Е. К., Полищук С. С., Червонис М. В. Методология и результаты селекции ячменя пищевого использования // Труды по прикладной ботани-

- ке, генетике и селекции ВИР (Российская Федерация). — 2013. — Т. 171. — С. 240–253.
8. Kihara M., Kaneko T., Ito K. Genetic variation of  $\beta$ -amylase thermo stability among varieties of barley *Hordeum vulgare* L. and relation to malting quality, *Plant Breeding*. — 1998. — Vol. 117. — P. 425–428.
9. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні в 2013 році. Український інститут експертизи сортів рослин. — К., 2013. — С. 30–37.

Надійшла 29.10.2014.

УДК 575.113.2:633.16:663.421

**Polyshchuk S. S., Morgun B. V., Rybalka O. I.** Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

### **POLYMORPHISM OF THE *Bmy1*, *LOX-1* AND *Wax* GENES AS DETERMINANTS OF THE BARLEY GRAIN NUTRITION VALUE**

Allelic variation study of the ***Bmy1*, *LOX-1* and *Wax*** genes coding for biosynthesis of several key enzymes determining of the nutritional barley grain value is presented in the paper. Neither of the important for nutrition barley grain quality alleles actively used worldwide in barley breeding was found among of the Ukrainian barley varieties collection.

УДК 575.113.2:633.16:663.421

**Полищук С. С., Моргун Б. В., Рыбалка А. И.**

### **ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *Bmy1*, *LOX-1* И *Wax* КАК ДЕТЕРМИНАТОВ ПРИЗНАКОВ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ ЗЕРНА ЯЧМЕНЯ**

Исследовано аллельное состояние генов ***Bmy1*, *LOX-1* и *Wax***, контролирующих активность нескольких ключевых ферментов, определяющих важные характеристики пищевой ценности зерна ячменя. Среди изученного коллекционного материала отечественных сортов ячменя не найдено ни одного аллельного варианта этих генов, которые сегодня активно используются в мировой селекции сортов ячменя, специализированных по направлениям пищевого использования зерна.